UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1969 • Thèse n° 585

Étude des effets de l'Éthanol à faible concentration sur les Bactéries

Thèse pour le Doctorat de l'Université
(Mention Pharmacie)
présentée et soutenue publiquement le
Vendredi 19 Décembre 1969

par Françoise SALLES
PHARMACIEN
Diplômée d'Œnologie
née le 23 Janvier 1944 à MONT-de-MARSAN (Landes)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM J. MASQUELIER, Professeur . . . . . Président
R. CASTAGNOU, Professeur . . . . . Juges
J. CANELLAS, Professeur . . . . . Juges
R. BAUTE, Agrégé . . . . . Juges

Éditions Bergeret, 2, rue Bergeret - BORDEAUX
— Tél: 91-12-58 —

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

Doyens honoraires : MM. G. PORTMANN, R. SIGALAS, F. TAYEAU.
Doyen : M. H. BRICAUD. - *Assesseurs* : MM. J. MASQUELIER, J. RIVIERE, C. BERAUD.

Professeurs honoraires :

MM. CHARRIER, DUBREUIL, CREYX, DARGET, R. SIGALAS, G. PORTMANN, M. RIVIERE, R. GIRARD, C. PIFFAULT, R. FABRE, R. DUFOUR, P. FOURMENT, E. AUBERTIN, X.J. DUBECQ, L. MASSE, A. LACHAPELE, G. VITTE, J. DESPONS, G. DUBOURG, DELMAS-MARSALET.

Maitre de conférences agrégé honoraire : M. BERGER.

Professeurs Titulaires

MM.	
P. DERVILLEE	*Médecine légale et Médecine du travail*
R. MANDOUL	*Zoologie et parasitologie*
R. CASTAGNOU	*Toxicologie et hygiène appliquée*
J. REBOUL	*Carcinologie*
P. MESNARD	*Chimie organique et Chimie analytique*
R. GRANDPIERRE	*Physiologie*
P. BROUSTET	*Clinique médicale cardiologique*
N	*Clinique chirurgicale*
F. TAYEAU	*Biochimie médicale A.*
G. MAYER	*Histologie et embryologie*
P. BLANQUET	*Physique nucléaire appliquée et radiobiologie*
R. SARIC	*Clinique médicale*
L. POUYANNE	*Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique.*
J.J. DUBARRY	*Hydro-climatologie thérapeutique et clinique des maladies de l'appareil digestif.*
F.J. TRAISSAC	*Clinique thérapeutique*
R. MAHON	*Clinique d'accouchements*
R. PAUTRIZEL	*Immunologie et biologie parasitaire*
Melle G. ROUGIER	*Biologie appliquée à l'éducation physique et aux sports.*
G. MOUSTARDIER	*Bactériologie*
E. BESSIERE	*Clinique ophtalmologique*
H. LEGER	*Anatomie pathologique*
J. MASQUELIER	*Matière médicale*
G. MORETTI	*Clinique médicale propédeutique et médecine tropicale*
N.	*Clinique oto-rhino-laryngologique*
P. LAUMONIER.....	*Clinique chirurgicale pleuro-pulmonaire*
J. LENG-LEVY	*Clinique médicale et des maladies infectieuses*
R. LETAC	*Pathologie et recherche chirurgicales*
R. QUILICHINI	*Pharmacie galénique*
E. NEUZIL	*Biochimie médicale B*

MM.

R. STOLL	*Biologie*
J. LANGE	*Clinique urologique*
P. FREOUR	*Hygiène et clinique de pneumophtisiologie*
F. RIGAUD	*Anatomie*
J. FAURE	*Médecine expérimentale et physiopathologie*
N.	*Clinique chirurgicale des maladies cardiaques*
J. VILLAR	*Clinique gynécologique*
P. LE COULANT	*Clinique des maladies cutanées et syphilitiques*
M. BERGOUIGNAN	*Clinique neurologique*
J. DUHAMEL	*Physique médicale et pharmaceutique*
R. BABIN	*Pharmacie chimique*
H. CHOUSSAT	*Pathologie médicale*
L. CHASTRUSSE	*Clinique obstétricale*
P. VERGER.....	*Clinique médicale des maladies des enfants*
F. LAPORTE	*Chirurgie générale*
R. TINGAUD	*Clinique chirurgicale*
H. LAUBIE	*Botanique et cryptogamie*
Cl. RICHIR	*Anatomie pathologique*
R. GOLSE	*Chimie générale et Chimie minérale*
J. BAILENGER	*Zoologie et biologie animale*
J. Cl. COLLETER	*Chimie analytique*
H. BRICAUD	*Médecine générale*
P. BENOIT	*Clinique odonto-stomatologique*
Cl. MARTIN-DUPONT....	*Clinique néphrologique*
J. CANELLAS	*Pharmacodynamie et hydrologie*
R. CANIVENC	*Histologie*
G. DELORME	*Electroradiologie*
J. DEPAULIS	*Séméiologie chirurgicale*
J. RIVIERE	*Séméiologie médicale*
H. DULONG DE ROSNAY	*Bactériologie*
R. CROCKETT	*Chimie organique et chimie analytique*
R. DARMAILLACQ	*Chirurgie générale*
H. POUYANNE	*Clinique neuro-chirurgicale*
R. CASTAING	*Réanimation respiratoire et anesthésiologie*

Professeur associé

M.

A. BAGHDIANTZ	*Physique et chimie (Pharmacie)*

Professeurs sans chaire

MM.

J. DAVID-CHAUSSE	*Médecine générale*
J. MARQUEVIELLE	*Biochimie médicale*
M. BLANC	*Neuro psychiatrie*
Cl. MASSE	*Chirurgie générale*
R. MARAUD	*Histologie et embryologie*
P. du PASQUIER	*Bactériologie*

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543911_0003

MM.

J. STAEFFEN	*Médecine générale*
J.P. DUBECQ	*Obstétrique*
G. NEVERRE	*Physiologie*
J. MEUNIER	*Histologie*
A. SERISE	*Hygiène*
P. FERRET-BOUIN	*Physique médicale*
J. VIDEAU	*Anatomie*
P. BLANCHOT	*Médecine générale*
L. DOUTRE	*Chirurgie générale*
P. LOISEAU	*Neuro-psychiatrie*
Cl. VRIGNAUD	*Physique pharmaceutique*
P. SOURREIL	*Dermato-vénéréologie*

Maitres de Conférences agrégés :

MM.

R. JENSEN	*Chimie biologique*
J. BROUSSIN	*Electroradiologie*
R. TESSIER	*Pneumo-phtisiologie*
Mme J. SECHET	*Biochimie médicale*
C. LAGARDE	*Carcinologie*
C. BERAUD	*Thérapeutique*
H. LAZARINI	*Médecine légale et médecine du travail*
J. SOUMIREU-MOURAT	*Obstétrique*
G. CABANIEU	*Médecine générale*
R. LE LOURD	*Pneumo-phtisiologie*
L. COURAUD	*Chirurgie générale*
J. BENTEGEAT	*Hématologie*
J. ROQUEBERT	*Pharmacodynamie*
L. ARNE	*Médecine générale et thérapeutique*
Cl. MARTIN	*Pédiatrie*
R. BAUTE	*Cryptogamie*
V. DARGELOS	*Microbiologie*
Melle S. LARCEBEAU	*Toxicologie*
M. GADRET	*Chimie analytique*
C. WONE	*Médecine générale et thérapeutique*
J. JULIEN	*Médecine générale et thérapeutique*
J.J. BATTIN	*Pédiatrie*
M. DALLOCCHIO	*Cardiologie et maladies vasculaires*
J. AUBERTIN	*Maladies infectieuses*
P. VERIN	*Ophtalmologie*
M. GOT	*Neuro-chirurgie*
J. TAVERNIER	*Electroradiologie : diagnostic et thérapeutique.*
J. VINCENT	*Physiologie et explorations fonctionnelles*
L. CHEVAIS	*Anesthésiologie*
G. GILLARDEAU	*Anesthésiologie*
J. HONTON	*Orthopédie et traumatologie*

MM.

M. BOMBART ..... *Orthopédie et traumatologie*
A. HUGUES ..... *Cancérologie*
M. SABATHIE ..... *Anesthésiologie*

Maitre de Conférences associé.

MM.

J. MOULINIER ..... *Hématologie*

Agrégés en exercice :

MM.

M. PORTMANN ..... *Oto-rhino-laryngologie*
F. BALLANGER ..... *Urologie*
P. BIRBIS ..... *Chirurgie générale*
J.P. CALAMEL ..... *Chirurgie générale*
L. TEXIER ..... *Dermato-syphiligraphie*
R. GENESTE ..... *Orthopédie*
F. FONTAN ..... *Chirurgie générale*
J. LASSERRE ..... *Orthopédie*

Agrégés libres

MM.

G. FAUGERE ..... *Obstétrique*
M. L'EPEE ..... *Médecine légale*
H. CABANIE ..... *Anatomie*
L. CORCELLE ..... *Ophtalmologie*

Chargés des fonctions de Maitre de Conférences :

MM.

P. BONJEAN ..... *Anatomie*
M. LAHOURCADE ..... *Parasitologie*
M. SENTENAC ..... *Anatomie*
G. DELMON ..... *Anatomie pathologique*
J. TRIBOULEY ..... *Immunologie, sérologie*
F.X. MICHELET ..... *Stomatologie*
E. JOUZIER ..... *Chimie biologique (Pharmacie)*
L. PINSON ..... *Oto-rhino-laryngologie*
F. COHADON ..... *Neuro-chirurgie*
J. Cl. ROQUES ..... *Physique médicale*
P. ESCHAPASSE ..... *Physique médicale*
J. PACCALIN ..... *Médecine générale et thérapeutique*

Le Conseiller administratif,
Chef des services administratifs :

André ARGILAS.

L'Attaché d'administration universitaire,
Directeur du cabinet :

Madame M.C. CHAPENOIRE

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation, ni improbation.

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1969 • Thèse n° 585

Étude des effets de l'Éthanol à faible concentration sur les Bactéries

Thèse pour le Doctorat de l'Université
(Mention Pharmacie)
présentée et soutenue publiquement le
Vendredi 19 Décembre 1969

par Françoise SALLES
PHARMACIEN
Diplômée d'Œnologie
née le 23 Janvier 1944 à MONT-de-MARSAN (Landes)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM J. MASQUELIER, Professeur . . . . . Président
R. CASTAGNOU, Professeur . . . . . } Juges
J. CANELLAS, Professeur . . . . . }
R. BAUTE, Agrégé . . . . . }

Éditions Bergeret, 2, rue Bergeret - BORDEAUX
— Tél: 91-12-59 —

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

ETUDE DES EFFETS DE L'ETHANOL A FAIBLE CONCENTRATION SUR LES BACTERIES

AVANT-PROPOS

Que Monsieur le Professeur MASQUELIER, Assesseur du Doyen, veuille bien trouver ici l'expression de notre profonde gratitude. Il a bien voulu manifester de l'intérêt à notre égard, nous a conseillée, orientée, a guidé notre recherche et nous en a fait découvrir les joies en nous faisant bénéficier de son immense savoir et en nous prodiguant ses précieux encouragements en toutes circonstances.

Nos très sincères remerciements vont aux Professeurs qui ont bien voulu siéger dans notre jury de thèse :

A Monsieur le Professeur CASTAGNOU qui rend passionnant son enseignement si imagé et nous a toujours accueillie avec amabilité et simplicité dans son laboratoire.

A Monsieur le Professeur CANELLAS qui a toujours su nous mettre en confiance et nous prodiguer sa gentillesse.

A Monsieur le Professeur Agrégé BAUTE qui s'est toujours intéressé à l'évolution de nos recherches, nous a conseillée et nous a accordé son soutien amical.

Il nous est particulièrement agréable de témoigner notre reconnaissance à tous ceux qui ont participé

à notre travail ou l'ont facilité :

Monsieur le Professeur Agrégé DARGELOS nous a accueillie avec bienveillance dans son laboratoire, nous a initiée à la microbiologie, nous a fait bénéficier de ses critiques et de ses suggestions avec patience et sympathie.

Madame DELAUNAY-BRETELLE, chef de travaux, dont la présence, les conseils judicieux, la sympathie et même l'amitié ont éclairé nos journées pendant trois ans.

Mademoiselle TRIAUD qui guida affectueusement nos premiers pas au laboratoire et dont l'amitié ne s'est jamais démentie.

Mademoiselle GARCIA qui a contribué avec efficacité et gentillesse à notre expérimentation.

Tous les membres des laboratoires de MATIERE MEDICALE et de MICROBIOLOGIE qui nous ont bien souvent prouvé leur sympathie.

*

INTRODUCTION

L'action bactéricide de l'alcool éthylique à 90° et surtout à 70° est bien connue, PORTER (19) en donne un énoncé très précis, lorsque MASQUELIER (16) étudie la sensibilité, vis-à-vis de Candida albicans, du chélate quercétol-cuivre. Celui-ci doit être solubilisé dans de l'alcool éthylique à la concentration de 1, 5 pour cent. Pour interpréter les résultats, il faut connaître l'action de la solution alcoolique de 1, 5° vis-à-vis du germe. A l'étonnement de l'auteur, l'expérience met en évidence un retard de croissance très net. Ce phénomène ne semble pas avoir été signalé récemment et paraît très intéressant. En effet, l'alcool éthylique est couramment employé comme solvant ; son action à faible dose pourrait s'ajouter à celle de diverses substances bactériostatiques ; la concentration active est susceptible d'être produite par des êtres vivants, en particulier par les levures. Un tel sujet trouve son application en pharmacie où toute bactériostase est intéressante, à plus forte raison si elle est produite par la concentration faible d'un corps assez peu toxique et en industrie alimentaire, particulièrement dans le cas du vin dont l'action bactéricide, mise en évidence depuis l'antiquité, a été récemment étudiée : la bibliographie et les travaux de DELAUNAY (5) peuvent être consultés;

l'alcool éthylique est peut-être susceptible d'augmenter le pouvoir des substances bactéricides du vin.

Au cours des recherches bibliographiques entreprises, nous n'avons trouvé trace d'aucun travail de synthèse concernant l'action de faibles concentrations d'alcool sur les bactéries. Seul DUCHENNE (7) aborde le problème mais l'action de l'alcool éthylique n'est pas étudiée en particulier : son pouvoir bactériostatique est signalé mais les variations de ce phénomène ne sont pas mentionnées, son explication n'est pas recherchée. Toutes les publications récentes traitent de cas très particuliers : action de l'alcool éthylique sur une bactérie bien déterminée ou sur un mécanisme métabolique. Nous n'avons trouvé aucun travail d'ensemble.

Il paraît donc opportun d'entreprendre des recherches personnelles. Nous allons, tout d'abord, étudier le phénomène proprement dit. Nous recherchons la dose minimale d'alcool éthylique susceptible de provoquer une bactériostase de 24 heures chez diverses espèces bactériennes gram positif et gram négatif. Nous observons les variations de nos résultats pendant deux ans, nous essayons de les expliquer en fonction des différences de repiquage, de la température de conservation de la souche.

Nous faisons ensuite des essais d'accoutumance à l'alcool. Nous cherchons à savoir comment réagissent diverses souches bactériennes cultivées sur des milieux contenant de l'alcool éthylique à doses variées. Nous étudions les différences morphologiques et métaboliques entre les bactéries cultivées en milieu normal d'une part, en milieu alcoolique d'autre part.

*

PREMIERE PARTIE

POUVOIR BACTERIOSTATIQUE DE FAIBLES CONCENTRATIONS D'ALCOOL ETHYLIQUE

CHAPITRE I

QUELQUES ELEMENTS DE BIBLIOGRAPHIE

Les seules recherches portant réellement sur le sujet qui nous préoccupe ont été entreprises par DUCHENNE (7) à la Faculté de Pharmacie de Paris, et par PEYNAUD et LAFON (14) à l'Institut d'Œnologie de Bordeaux. Ceci confirme d'ailleurs les deux pôles d'intérêt de ce travail indiqués dès l'introduction : la pharmacie et l'œnologie.

I - LES TRAVAUX DE DUCHENNE

En vue de l'étude de l'activité bactériostatique de substances insolubles dans l'eau, DUCHENNE (7) recherche les solvants dont les propriétés bactériostatiques sont les plus faibles. Il traite, parmi d'autres cas, celui de l'alcool éthylique.

1° - DETERMINATION DE LA DOSE BACTERIOSTATIQUE.

- Mode opératoire.

L'auteur établit des gammes de tubes contenant toujours la même quantité de substance nutritive et des

concentrations différentes d'alcool éthylique. Pour connaître le nombre de germes par millilitre, une courbe d'étalonnage est réalisée au photomètre Meunier, à l'aide d'une cellule compte-microbes. La richesse de l'ensemencement est ramenée lors de chaque expérience à deux millions de germes par millilitre. Les tubes sont ensuite placés à l'étuve à 37° pour incubation des cultures. Au bout de 24 heures, la croissance bactérienne éventuelle provoque le trouble du milieu de culture. Si ce dernier reste limpide, l'auteur affirme qu'il y a bactériostase de 24 heures.

- Résultats :

Les résultats sont consignés dans le tableau I. La dose moyenne d'alcool éthylique provoquant une bactériostase de 24 heures chez les germes étudiés ici est de 5° 1.

- Variations :

L'auteur constate des variations très nettes de résultat selon les espèces de germes considérés et même selon les souches à l'intérieur d'une même espèce.

La méthode de détermination influence beaucoup le résultat : des expériences ont été effectuées par la méthode des dilutions en milieu solide : les doses bactériostatiques étaient sensiblement plus élevées.

La composition du milieu de culture doit aussi être précisée rigoureusement car elle provoque des fluctuations importantes.

T A B L E A U I

DEGRE D'ALCOOL ETHYLIQUE PROVOQUANT
UNE BACTERIOSTASE DE 24 HEURES

G E R M E	*DEGRE ALCOOLIQUE*	*MILIEU DE CULTURE*
Saccharomyces cerevisiae	8,5	Eau peptonée glucosée
Bacillus subtilis	7,5	Bouillon nutritif
Streptococcus foecalis souche ATCC 9790	7,5	Bouillon nutritif
Staphylococcus pyogenes aureus	6,5	Bouillon nutritif
Corynebacterium cutis commune	6,5	Bouillon + ascite
Escherichia coli	6,5	Bouillon nutritif
Proteus vulgaris	6,5	Bouillon nutritif
Streptococcus pyogenes	4,5	Bouillon + ascite
Corynebacterium diphteriae	4,5	Bouillon + ascite
Klebsiella pneumoniae	4,5	Bouillon nutritif
Welchia perfringens	4,5	Bouillon VF.
Clostridium sporogenes	4,5	Bouillon VF
Candida	4,5	Eau peptonée glucosée
Aspergillus niger	3,5	Eau peptonée glucosée
Corynebacterium pseudodiphtericum	2,5	Bouillon + ascite
Pseudomonas aeruginosa	2,5	Bouillon ordinaire
Plectridium putrificum	2,5	Bouillon VF

Les germes sont classés par ordre de sensibilité croissante à l'alcool éthylique.

2° - EXPERIENCES EFFECTUEES AU MOYEN DU BIO-PHOTOMETRE DE BONNET MAURY ET JOUAN.

DUCHENNE a longuement étudié les possibilités de l'appareil et les a ensuite exploitées dans le cas de Staphylococcus aureus. Voici ses conclusions :

" L'alcool éthylique à 1, 2, 3, 4 % en volume provoque un ralentissement régulier de la croissance qui ne se fait plus selon un rythme exponentiel. Ajouté à la culture en phase logarithmique, l'alcool exerce une activité bactério-freinatrice aux doses faibles et bactériolytique aux doses fortes, l'action bactériolytique étant proportionnelle à la concentration. "

II - LES TRAVAUX DE L'INSTITUT D'OENOLOGIE DE BORDEAUX.

PEYNAUD et LAFON (14) s'intéressent à la fermentation malolactique. Ce phénomène améliore sensiblement la qualité des vins. Il dépend intégralement de l'activité des " bactéries lactiques " : terme général recouvrant de nombreuses espèces de coques et surtout de bacilles. La fermentation alcoolique précède toujours dans le temps la fermentation malolactique. Les bactéries lactiques survivent et même témoignent d'une activité métabolique intense dans des milieux alcoolisés. Cependant, parfois la fermentation malolactique n'a pas lieu : était-on en présence dans ce cas d'un accroissement de sensibilité vis-à-vis de l'alcool de la part des bactéries lactiques ? PEYNAUD et son école étudient donc l'influence du degré alcoolique sur la croissance des bactéries lactiques et le degré alcoolique limite de croissance des bactéries suivant la nature du milieu nutritif.

1° - INFLUENCE DU DEGRE ALCOOLIQUE SUR LA CROISSANCE DES BACTERIES LACTIQUES.

Mode opératoire.

Les bactéries sont ensemencées dans des flacons bouchés limonade de 600 ml contenant 50 % de moût, de l'extrait de levure, divers facteurs de croissance. La croissance est déterminée sur un prélèvement stérile des cultures considérées, par mesure de trouble au photocolorimètre bicellulaire d'Electrosynthèse. Une courbe étalon établie à l'avance, donne une correspondance entre la graduation du photocolorimètre et le poids sec des bactéries.

Influence de l'alcool sur la population et l'acidité finale.

Voici les conclusions de l'expérimentation de LAFON (14) sur les bacilles lactiques :

" Il y a deux ordres de phénomène : un effet retardateur et limitant léger jusqu'à 10 et 11°, un effet brusquement plus fort au-dessus de cette limite.

Un peu d'alcool ne modifie pas la croissance rapide mais la limite. Beaucoup d'alcool provoque une croissance très retardée et ralentie. Le passage d'un phénomène à l'autre est brusque et intervient à 11°. Pour les bactéries les moins alcoophiles, le point d'inflexion se situe vers 8 à 10°, pour les bactéries les plus résistantes vers 12°.

Il semble qu'il y ait deux sortes d'inhibition : il n'y a pas de freinage régulier lorsqu'on augmente progressivement la dose d'alcool. Jusqu'à 11°, toutes les cellules sont gênées mais se reproduisent presque autant. Au-dessus, il semble qu'il n'y ait que quelques cellules résistantes et qu'il leur faut longtemps pour se multiplier. "

Degré limite de croissance.

Le tableau II donne un aperçu des résultats, Les souches résistent bien jusqu'à 10-11°, les degrés limites de croissance vont surtout de 12 à 15°.

TABLEAU II

DEGRE LIMITE DE CROISSANCE

Degré	*Nombre de souches ne résistant pas à ce degré*		
	bacilles	*coques*	*total*
15	9	1	10
14	3	5	8
13	5	14	19
12	3	14	17
11	3	5	8
10	-	1	1
8	-	1	1
Total des souches expérimentées	23	41	64

2° - DEGRE ALCOOLIQUE LIMITE DE CROISSANCE DES BACTERIES SUIVANT LA NATURE DU MILIEU NUTRITIF.

Les auteurs concluent :

" La composition du milieu a un rôle primordial sur la croissance et la fermentation des bactéries lactiques. Les degrés alcooliques limite de croissance sont fonction de la richesse du milieu pour toutes les bactéries. Les

bactéries supportent plus ou moins bien l'alcool suivant leur vitalité et leur faculté de multiplication. Le facteur limitant essentiel est le pH, tout se passe comme s'il y avait synergie entre l'alcool et le pH. La richesse en azote intervient.

III - CONCLUSIONS

A la lumière des travaux précédemment cités, il paraît intéressant d'étudier le comportement de nombreuses espèces bactériennes vis-à-vis de l'alcool, à l'aide du biophotomètre.

*

CHAPITRE II

RECHERCHES PERSONNELLES

Ce chapitre sera consacré tout d'abord à l'exposé de recherches expérimentales que nous avons effectuées sur la sensibilité des bactéries aux faibles concentrations d'éthanol ; ensuite, nous tenterons d'interpréter nos résultats à la lumière des données bibliographiques traitant de cette question.

A/ RECHERCHES EXPERIMENTALES.

Elles ont porté sur deux types d'investigations : l'étude de la bactériostase de 24 heures et l'action de faibles concentrations d'éthanol.

I - BACTERIOSTASE DE 24 HEURES.

Nous recherchons la dose d'alcool éthylique inhibant la multiplication des bactéries pendant 24 heures.

1°- Technique

Essais préliminaires en tubes.

But recherché.

Nous allons utiliser le biophotomètre de Bonnet - Maury et Jouan. Cet appareil comporte 6 cuves dans lesquelles nous pouvons introduire des compositions différentes. Afin de ne pas trop multiplier les expériences, nous effectuons tout d'abord un essai préliminaire en tube, selon la méthode des dilutions en milieu liquide utilisée par DUCHENNE (7), pour avoir un ordre de grandeur des concentrations d'alcool éthylique à expérimenter.

Modalités de l'expérience.

Des tubes stériles reçoivent tous la même quantité d'un bouillon de culture ensemencé de façon homogène avec une culture de 24 heures du germe considéré. Le volume est complété à 10 ml à l'aide d'eau et d'alcool éthylique absolu de façon à obtenir une gamme allant de 0 à 9°, comme l'indique le tableau III

TABLEAU III

METHODE DES DILUTIONS EN TUBES

Tubes	*Témoin.*	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Bouillon ensemencé, en ml	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
Degré	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Alcool absolu, en ml	0	0, 1	0, 2	0, 3	0, 4	0, 5	0, 6	0, 7	0, 8	0, 9
Eau, en ml	4	3, 9	3, 8	3, 7	3, 6	3, 5	3, 4	3, 3	3, 2	3, 1

Tous ces tubes sont portés à l'étuve à 37° pendant 24 heures après homogénéisation.

Résultats.

Au bout de 24 heures, la multiplication des bactéries se traduit par le trouble du milieu de culture, repéré ici simplement à l'œil. Cette méthode est tout à fait grossière : l'alcool est plus ou moins amalgamé au milieu de culture par une agitation manuelle, l'œil ne saisit qu'imparfaitement les différences de trouble. Elle n'a pour but que de limiter le nombre d'expériences au biophotomètre.

Biophotomètre.

But recherché.

Nous voulons établir les doses d'alcool éthylique inhibant pendant 24 heures la multiplication des bactéries étudiées. Nous étudierons l'effet de différentes concentrations d'alcool éthylique sur la croissance des germes considérés. Nous recherchons des résultats assez précis en valeur absolue, reproductibles et comparables entre eux. Nous voulons simplifier au maximum les manipulations de façon à effectuer de nombreuses expériences. Pour atteindre ce but, nous avons à notre disposition le biophotomètre de Bonnet - Maury et Jouan.

Mise au point d'une " normalisation ".

Le biophotomètre mesure le trouble du milieu de culture au cours de la croissance en fonction du temps d'incubation. Les germes sont maintenus dans une enceinte calorifugée à la température désirée. L'agitation du milieu de culture est réalisée par un agitateur magnétique, elle est réglable. Nous avons un appareil simple mais assez peu précis, sa sensibilité est aussi relativement limitée : de 10^5 à 10^{10} germes par millilitre selon DUCHENNE (7).

Nous ne recherchons donc pas une précision exagérée mais nous voulons travailler dans les limites de sensibilité de l'appareil et toujours dans les mêmes conditions.

L'appareil mesure le trouble d'un milieu ; pour comparer nos résultats nous devons effectuer des ensemencements provoquant le même " trouble initial " . Nous travaillons exclusivement avec le biophotomètre. Nous introduisons dans une cuve de l'appareil, 10 ml de bouillon nutritif utilisé pour la culture du germe et pour le reste de l'expérience. Nous portons la cuve dans l'enceinte calorifugée et avec la vis de réglage nous amenons l'aiguille de l'appareil enregistreur à la graduation 100 : 100 % de transmission. Dans cette même cuve, nous remplaçons 5 ml de bouillon par 5 ml de la culture de 24 heures du germe à étudier. La cuve est replacée dans l'appareil, nous lisons la graduation X, indiquée par l'enregistreur. Nous réalisons cette première dilution au demi pour être dans les limites de sensibilité du biophotomètre: la transmission est comprise entre 25 et 50 %.

Nous admettons que dans ces limites, la transmission de la lumière par l'appareil est inversement proportionnelle à la concentration de germes. Nous désirons opérer de façon à toujours partir de cultures donnant 50 % de la transmission : point de sensibilité idéal de l'appareil. Pour obtenir 50 % de transmission, il faut $\frac{10\ X}{50} = y$ ml de culture : 10-yml de culture sont remplacés par du bouillon. Pour chaque expérience, nous avons effectué une vérification en regardant la graduation indiquée par l'appareil pour le contenu de la cuve ayant subi nos manipulations. Nous avons recommencé la normalisation lorsque l'erreur était supérieure à 1 °/₀₀.

Nous avons cherché ensuite à obtenir des courbes de croissance nettes avec une phase de latence de trois heures environ et une phase de croissance logarithmique assez étalée sur cinq heures. A partir de la culture 'hormalisée " : donnant 50 % de transmission au biophotomètre, nous réalisons les dilutions suivantes :

tube A	1 ml de culture normalisée	9 ml de bouillon
tube B	5 ml du contenu du tube A	5 ml de bouillon
flacon C	1 ml du contenu du tube B	49 ml de bouillon

Ce bouillon ensemencé sera ensuite réparti dans les cuves n° 2, 3, 4, 5, 6 de l'appareil.

Milieu.

Nous utilisons du bouillon nutritif à la tryptose de la Maison Difco. Les germes y croissent très bien, il est très clair. Il est stérilisé à 120°, 30 minutes à l'autoclave. Nous employons toujours le même lot pour la culture, la normalisation et l'expérience proprement dite.

La gamme de dilutions.

Nous présentons un exemple au tableau IV. Nous étudions 4 concentrations d'alcool éthylique différentes, une cuve sert à vérifier la stérilité du matériel et n'est pas ensemencée, une autre ne contient pas d'alcool et sert de témoin. Les germes ont tous à leur disposition la même quantité de substance nutritive.

TABLEAU IV

GAMME DE DILUTION TYPE

Cuve	1 *zéro*	2 *témoin*	3	4	5	6
Bouillon ml	8	8	8	8	8	8
Alcool ml	0	0	q	r	s	t
Eau ml	2	2	2-q	2-r	2-s	2-t

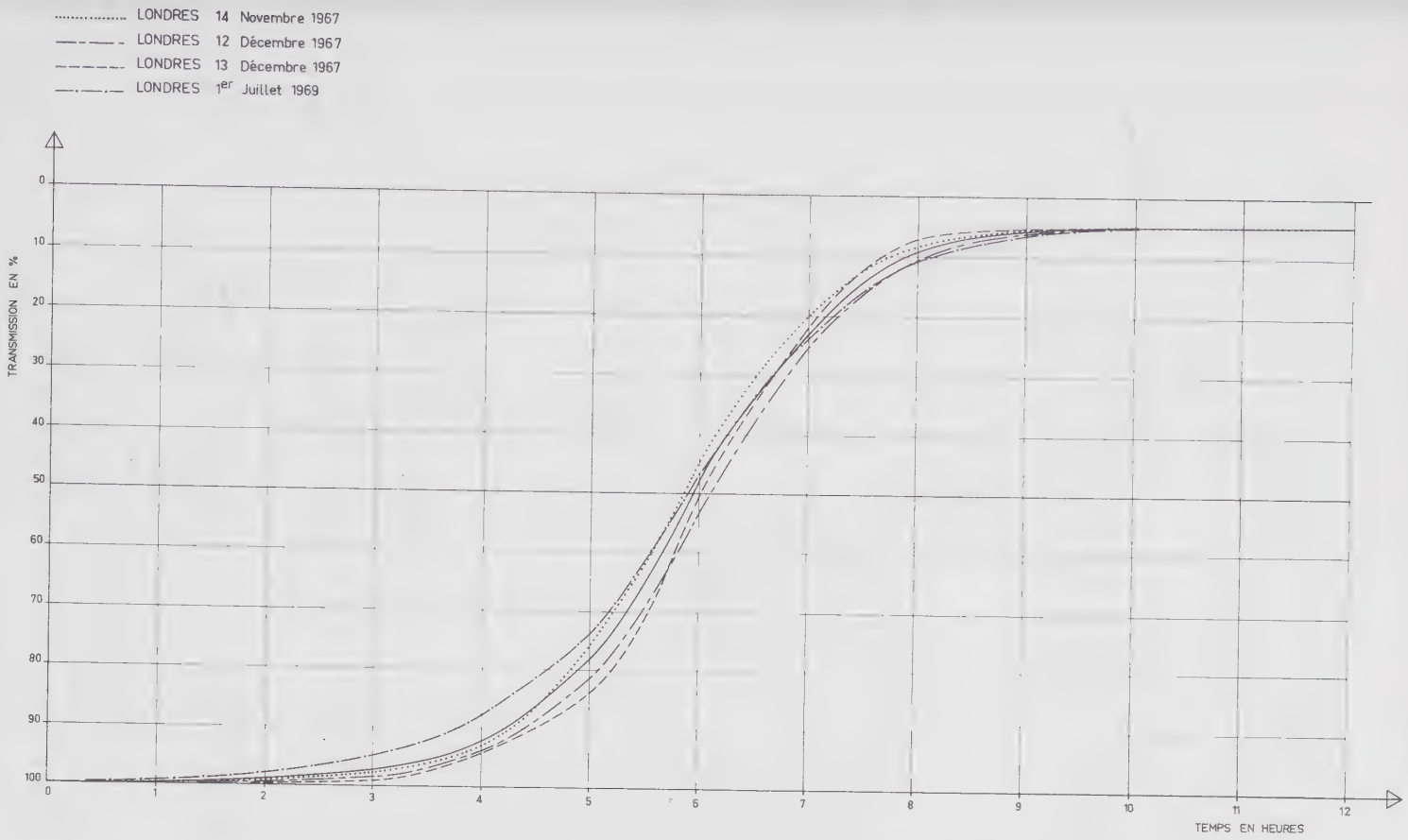


FIGURE 1 – VERIFICATION DE LA METHODE SUR LE STAPHYLOCOQUE LONDRES

La cuve 1 contient le bouillon utilisé dans toute l'expérience mais il n'est pas ensemencé.

Vérification.

Les courbes de croissance témoins arrivent à être superposées comme le montre la figure 1. Nous pouvons donc comparer nos résultats.

2° - Les germes étudiés.

Staphylococcus pyogenes	souche de l'Institut Pasteur Londres
Staphylococcus pyogenes	résiste à la pénicilline, vient d'un prélèvement.
Streptococcus pyogenes A ..	souche de l'Institut Pasteur
Bacillus subtilis	souche de l'Institut Pasteur
Proteus mirabilis	souche de l'Institut Pasteur A 235
Escherichia coli	souche de l'Institut Pasteur
Salmonella pullorum	souche de l'Institut Pasteur
Pseudomonas aeruginosa ...	vient d'un prélèvement
Brucella B 19	

3° - Les résultats.

Le tableau V en donne un résumé. Les germes sont classés par ordre de sensibilité croissante à l'alcool éthylique. La dose moyenne provoquant une bactériostase de 24 heures chez les germes étudiés ici est de 4, 6°.

4° - Variations des résultats au cours des différentes expériences.

En fonction de la souche.

Nos deux souches de Staphylocoque, l'un en provenance de l'Institut Pasteur, l'autre venant d'un prélèvement recueilli à l'hôpital ont réagi différemment. La

T A B L E A U V

DOSE MINIMALE D'ALCOOL ETHYLIQUE
PROVOQUANT LA BACTERIOSTASE
DE 24 HEURES DES GERMES ETUDIES

Germes	*Degré d'alcool*
Bacillus subtilis	6°
Staphylococcus résistant à la pénicilline	6°
Escherichia coli	6°
Streptococcus pyogenes A	5°
Proteus mirabilis	5°
Salmonella pullorum	4°
Staphylococcus, Londres	3,5°
Pseudomonas aeruginosa	3°
Brucella	3°

souche la plus pathogène pour l'homme se montre la plus résistante à l'alcool : la croissance du staphylocoque Londres est arrêtée pendant 24 heures si le milieu de culture contient 3, 5° d'alcool, pour obtenir le même résultat avec la souche très pathogène, il faut une concentration de 6 °.

En fonction du milieu de culture.

Le bacille pyocyanique étudié ici est très aérophile. Au bout de huit heures d'incubation, tous les germes se rassemblent à la surface supérieure du bouillon formant un " voile " épais, le reste du milieu est presque limpide. Ce phénomène rend impossible toute mesure au photomètre. Nous avons introduit du tween 80 dans le bouillon à la tryptose Difco à raison de 500 mg/litre. Les germes ainsi cultivés se sont trouvés fragilisés et nous avons constaté une diminution de la concentration d'alcool arrêtant la croissance pendant 24 heures.

En fonction du temps.

Les caractères d'une souche conservée très longtemps en culture varient : nos études de sensibilité aux antibiotiques nous l'ont souvent prouvé. Voici les résultats obtenus avec le staphylocoque Londres.

TABLEAU VI

VARIATION DES RESULTATS EN FONCTION DU TEMPS

Date d'expérience	*Décembre 1967*	*Juillet 1968*	*Octobre 1968*
Degré provoquant une bactériostase de 24 heures	3, 5	4, 5	5

Nous avons pensé que les différences de température de stockage de la souche ou la fréquence des repiquages étaient peut-être la cause de ces variations. Nous avons donc entrepris des études dans ce sens.

En fonction de la température de conservation de la souche.

Nous avons tout d'abord comparé, par la méthode des dilutions en tubes, le comportement de souches conservées sur gélose tryptose Difco à température ambiante et de germes cultivés sur le même milieu, puis portés au bout de 24 heures à + 4° C au frigidaire. Ces derniers paraissaient plus sensibles à l'alcool : une différence de 0°5 apparaissait dans les doses d'éthanol provoquant une bactériostase de 24 heures.

Au bout de trois mois, l'étude après " normalisation " des ensemencements initiaux a montré que la croissance normale du germe était affectée par un stockage de la souche au froid mais pas sa sensibilité à l'alcool.

En fonction de la fréquence de repiquage de la souche.

Par la méthode des dilutions en milieu liquide, après " normalisation " des ensemencements, nous étudions la sensibilité à l'alcool éthylique du staphylocoque Londres. Nous ensemençons en bouillon des germes conservés sur gélose sans autre repiquage respectivement depuis 10, 9, 4, 3 mois et 11 jours.

Nous observons une différence de 0, 5 ° entre les doses minimales d'éthanol provoquant une bactériostase de 24 heures chez des germes non repiqués depuis 11 jours ou 3 mois d'une part, et 9 ou 10 mois d'autre part. Ces derniers sont plus sensibles à l'alcool éthylique.

5° - Discussion.

Les doses d'éthanol nécessaires pour provoquer une bactériostase de 24 heures sont inférieures de 1° au moins à celles trouvées par DUCHENNE (7). Les conditions expérimentales sont différentes : notre technique bénéficie de l'agitation permanente de la culture.

Toutes nos études de variation de sensibilité à l'alcool éthylique conduisent à la conclusion suivante : les résultats sont reproductibles à condition d'opérer selon un protocole expérimental rigoureusement précisé. Toutes les différences que nous avons remarquées proviennent de facteurs divers, physiques ou chimiques, ayant contribué à une fragilisation générale du germe étudié et affectant sa croissance normale en milieu habituellement employé.

II - ACTION DE FAIBLES CONCENTRATIONS D'ALCOOL ETHYLIQUE.

1° - Etude du retard aux 50 % de transmission.

But recherché.

Nous avons établi les doses d'alcool éthylique provoquant une bactériostase de 24 heures chez un certain nombre de bactéries gram positif et gram négatif. Il paraît intéressant de connaître le comportement de ces germes vis-à-vis de concentrations d'éthanol inférieures : la croissance n'est-elle pas affectée ? Avons-nous affaire à une perturbation proportionnelle à la quantité d'alcool éthylique présente dans le milieu ou à un phénomène brutal apparaissant à partir d'une certaine dose ?

Technique.

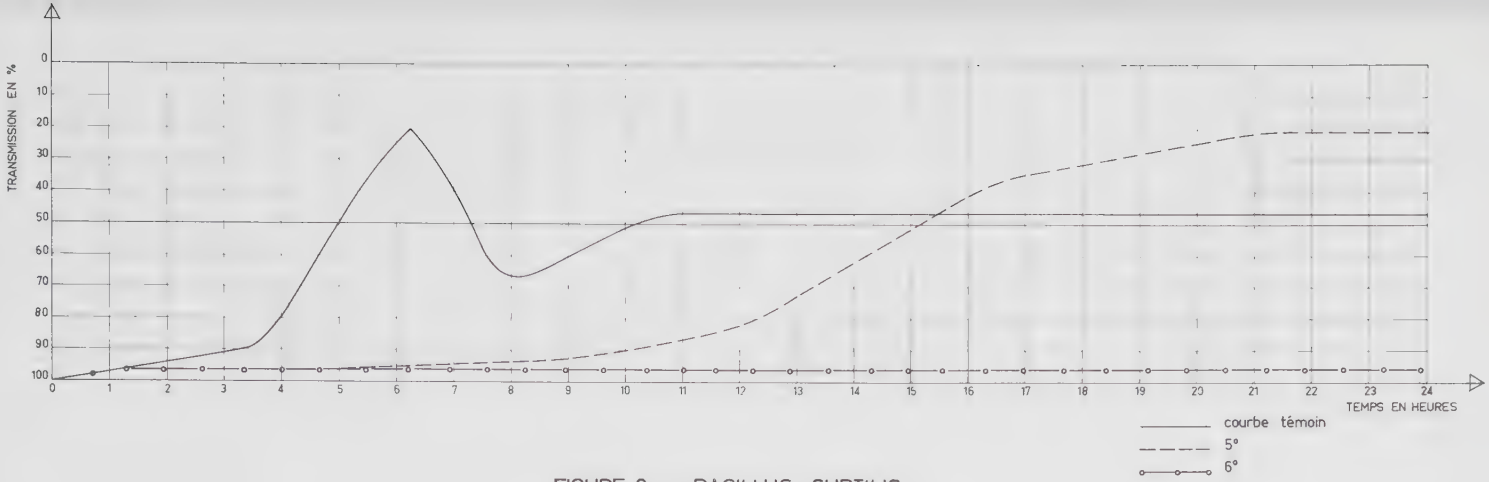
Nous reprenons exactement la technique d'utilisation du biophotomètre décrite au paragraphe I. La

T A B L E A U VII

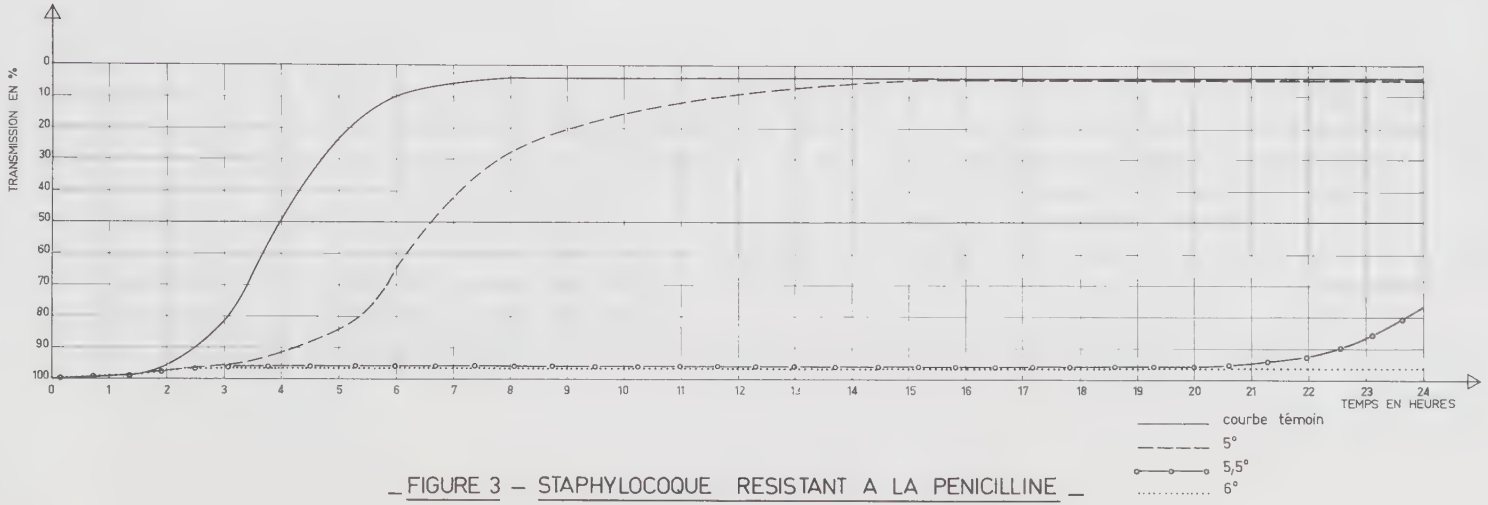
ACTION DE FAIBLES QUANTITES D'ALCOOL ETHYLIQUE :

ETUDE DU RETARD AUX 50 % DE TRANSMISSION

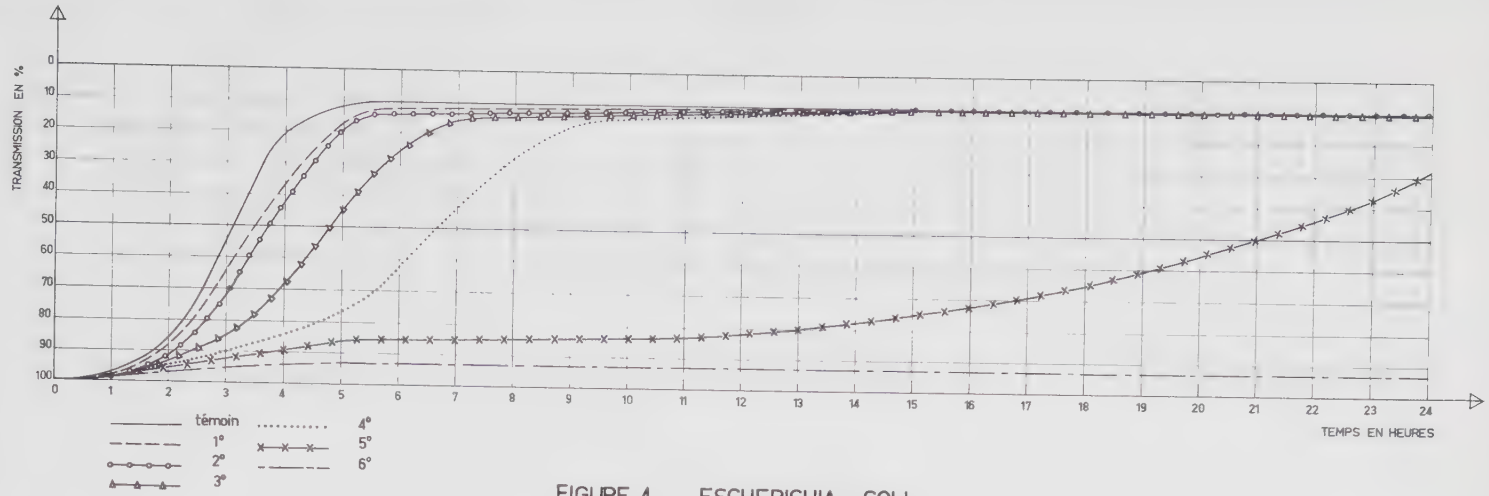
GERMES	RETARD AUX 50 % DE TRANSMISSION								
	1°	2°	2,5°	3°	3,5°	4°	5°	5,5°	6°
Bacillus subtilis	-	-	-	-	-	-	10 h. 30	-	Bactériostase de 24 h.
Staphylocoque résistant à la pénicilline	-	-	-	-	-	-	2 h. 30	21h30	Bactériostase de 24 h.
Escherichia coli	20mn	45mn	-	1h30	-	3 h 30	17 h. 45	-	-
Proteus mirabilis	1 h.	2h15	-	3h15	-	8 h 30	bactériostase de 24 h.	-	-
Salmonella pullorum	-	2 h.	-	3h45	-	bactériostase de 24 h.	-	-	-
Staphylocoque Londres	1 h.	2h15	3h30	8h30	bactériostase de 24 h.	-	-	-	-
Klebsiella	45mn	1 h.	-	2h15	-	6 h.	-	-	-



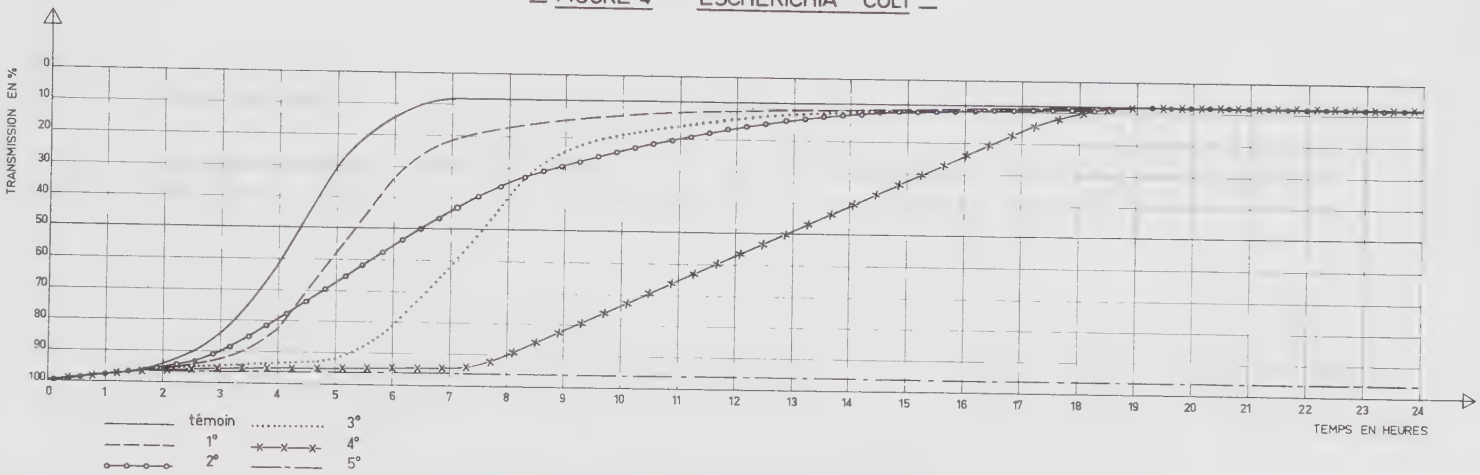
_ FIGURE 2 - BACILLUS SUBTILIS _



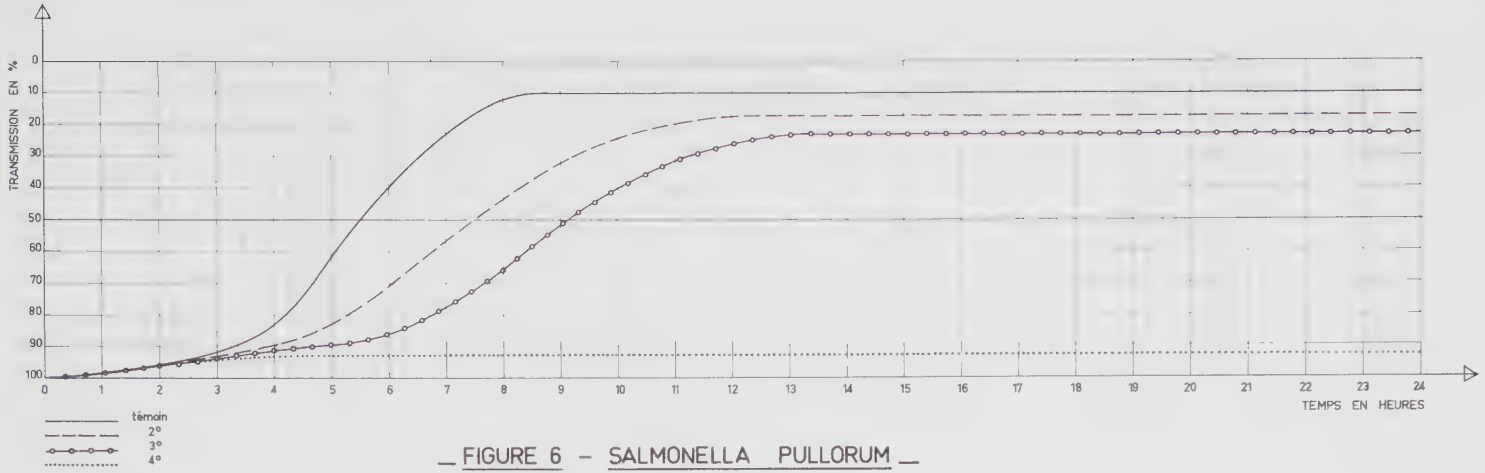
_ FIGURE 3 - STAPHYLOCOQUE RESISTANT A LA PENICILLINE _



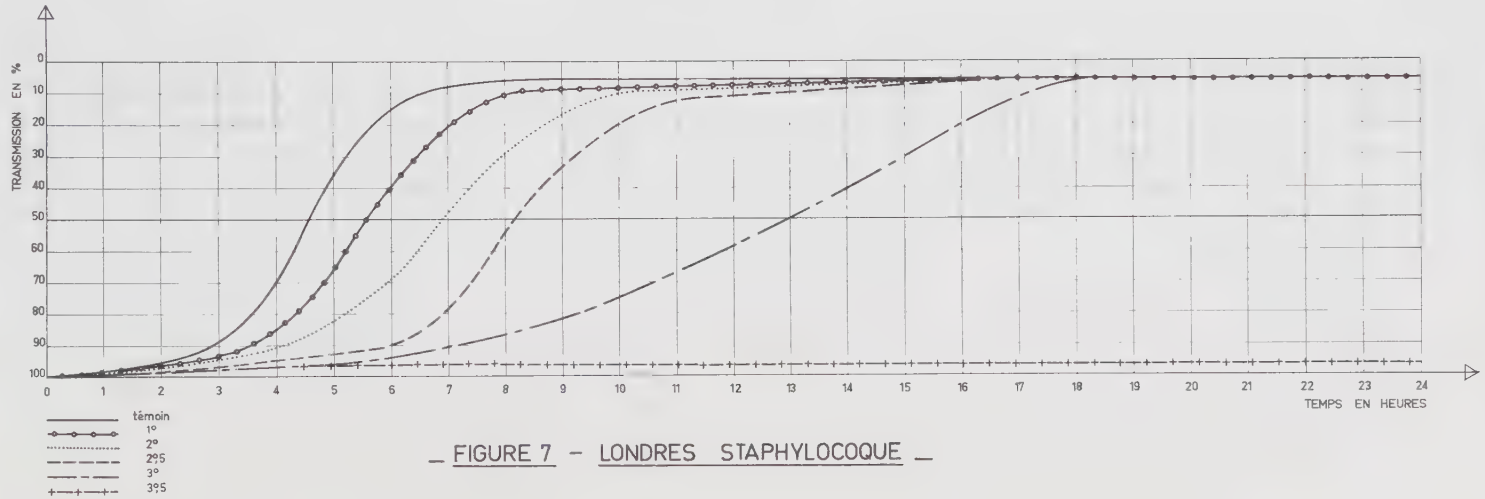
— FIGURE 4 — ESCHERICHIA COLI —



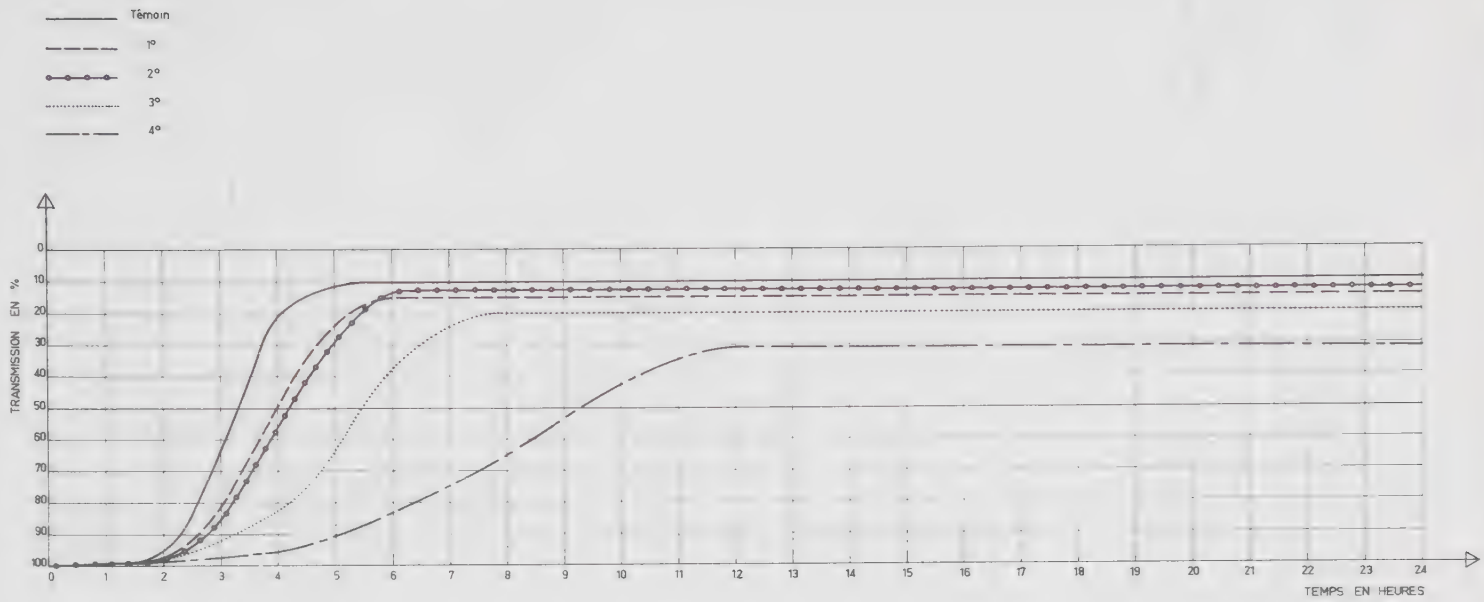
— FIGURE 5 — PROTEUS MIRABILIS —



_ FIGURE 6 - SALMONELLA PULLORUM _



_ FIGURE 7 - LONDRES STAPHYLOCOQUE _



— FIGURE 8 — KLEBSIELLE —

comparaison des phases de latence nous donnera quelques indications mais nous préférons considérer les temps mis par les cultures des différents germes pour ne transmettre que 50 % de la lumière fournie initialement par l'appareil : nous travaillons ainsi dans la meilleure zone de sensibilité de l'appareil selon une technique depuis longtemps employée au laboratoire de Matière Médicale.

Résultats.

L'étude du tableau VII et des figures 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8 montre que l'alcool éthylique agit à de faibles doses comprises entre 1 et 4 °, le retard de croissance est proportionnel à la concentration en alcool.

2° - Influence de très faibles concentrations d'éthanol.

But.

L'alcool freine-t-il toujours la croissance ? Sommes-nous en présence d'un phénomène fréquent en bactériologie : production par un même corps à des concentrations différentes d'une stimulation de la croissance puis d'une bactériostase, enfin d'une action bactéricide .

Les recherches.

Pour des concentrations inférieures à 1 °, nous avons de nouveau mis en œuvre la technique d'utilisation du biophotomètre indiquée au paragraphe 1. Lors de notre précédente expérience, nous avons adopté cette méthode parce que les courbes de croissance témoins ainsi obtenues étaient pratiquement superposées pour un même germe expérimenté à des dates très différentes. Nous voulons cependant tenir compte de l'imperfection des manipulations et de la sensibilité relative de l'appareil. Nous considérons, comme précédemment, le temps mis par les

cultures des différents germes pour ne transmettre que 50 % de la lumière fournie initialement par l'appareil. A ce niveau, des différences inférieures à une heure entre le témoin et les germes cultivés sur alcool nous paraissent ininterprétables. Pour des concentrations d'éthanol inférieures à 1 degré, l'écart n'excède pas une heure : nous ne pouvons donc pas retenir nos résultats. Il faut mettre au point un autre protocole expérimental.

Nous remarquons toutefois, les restrictions précédentes étant bien admises, une certaine stimulation de la croissance dans le cas du staphylocoque Londres. Nous nous permettons de signaler ce résultat car il sera retrouvé dans notre deuxième série d'expériences.

B/ INTERPRETATION DES RESULTATS EXPERIMENTAUX.

Par quels mécanismes l'alcool éthylique perturbe-t-il la croissance des bactéries, l'arrête-t-il et même peut-il provoquer leur destruction ? Nous avons cherché à répondre à cette question par une étude bibliographique. Nous envisagerons successivement le catabolisme de l'éthanol, le matériel enzymatique à la disposition des bactéries pour réaliser ce catabolisme, enfin le mode d'action de l'alcool éthylique sur les bactéries.

I - CATABOLISME DE L'ALCOOL.

En 1956, BARKER (3) envisage le cas de Methanobacillus omelianski et conclut : " Methanobacillus omelianski oxyde l'alcool en anaérobiose en présence de CO_2 :

$$2\ CH_3\text{-}CH_2OH + CO_2 \longrightarrow 2\ CH_3\text{-}COOH + CH_4$$

Le méthane produit par cette fermentation est entièrement formé par réduction du $C0_2$. L'oxydation de l'alcool dépend de l'apport de $C0_2$.

Les travaux de JOHNS (AT) et BARKER (HA) (11) en 1960, montrent que cette oxydation peut avoir lieu en l'absence de $C0_2$ selon la réaction :

$$CH_3 - CH_20H + H_20 \longrightarrow CH_3 - C00^- + H^+ + 2\ H_2$$

Nous voyons que dans tous les cas l'éthanol est oxydé en acide acétique.

II - LE MATERIEL ENZYMATIQUE MIS EN JEU PAR LES BACTERIES POUR METABOLISER L'ALCOOL ETHYLIQUE.

Nous pouvons ainsi résumer les conclusions de Mc PHEDRAN et de ses collaborateurs (17) travaillant sur Aerobacter aerogenes : " Le métabolisme de l'alcool chez les bactéries est régi par une alcool déshydrogénase. Elle peut oxyder l'éthanol ou le produire selon les conditions de croissance. Elle a un rôle différent en aérobiose et en anaérobiose : sa concentration ne dépend pas d'addition d'éthanol dans le milieu ou de l'oxygène moléculaire mais de l'équilibre des donneurs et des accepteurs d'hydrogène à l'intérieur de la cellule : l'accumulation de DPN réduit provoquerait l'induction, ou l'accumulation de DPN provoquerait la répression de l'enzyme : cette dernière hypothèse n'a pas été vérifiée. "

Selon les bactéries envisagées, l'alcool deshydrogénase nécessite des accepteurs d'hydrogène très différents, elle est inhibée par des corps très différents. La comparaison des travaux d'ANTHONY et ZATMAN (1) étudiant Pseudomonas sp H 27, de ROSENBERG (20) et HOLMES (10) prenant le cas d'un Corynebacterium

et de DE LEY et KERSTERS (6) celui des bactéries acétiques, montre cette diversité. En particulier, il a été montré que certaines alcools déshydrogénases exigeaient du NAD alors que d'autres étaient complètement indépendantes de cette substance.

III - MODE D'ACTION DE L'ALCOOL SUR LES BACTERIES.

Nous avons trouvé trois sortes d'action de l'éthanol sur les bactéries : sur les mitochondries, la synthèse enzymatique et enfin le cas très particulier des spores.

1° - Action sur les mitochondries.

Les conclusions des auteurs consultés PALMIERI, FRANCAVILLA et DINOI (18) d'une part, et WAND (22) d'autre part, ne concordent pas toujours. Un point reste certain : l'éthanol agit sur les mitochondries. La consommation d'oxygène est augmentée ou diminuée selon la concentration d'alcool et l'âge des mitochondries. Son action se situe au niveau de la membrane mitochondriale dont il affecte la perméabilité. Les processus d'oxydation et de phosphorylation sont perturbés. Ceci peut-être rapproché du fait précédemment cité : le taux d'alcool déshydrogénase est lié à l'équilibre redox intra cellulaire.

2° - Action sur la synthèse enzymatique.

Les travaux de KUSHNER en 1959 et 1960 (12 et 13), de THEOAROV et VELITCHOV (21) et de BALTSCHEFFSKY (2) aboutissent aux constatations suivantes : l'éthanol stimule les déshydrogénases, certainement par les changements structuraux de la configuration des mitochondries, dépendant de la concentration employée. Il n'y a pas d'action sur la phosphatase, la catalase, la

pénicillinase. Il inhibe les enzymes ayant trait à la destruction des substances graisseuses, les lipases, la formation de l'ATP et la phosphorylation. Nous ne sommes pas en présence d'une action chimique mais d'une action physique au niveau des mitochondries.

3° - Action sur les spores.

HOLMES et LEVINS (10) ont réussi à activer les spores de Bacillus megatherium en faisant agir pendant cinq minutes une solution d'alcool à 60 %. Ceci ouvre la voie à des expériences de tyndallisation à froid, par deux passages à l'alcool : l'un tuant les germes et activant les spores, le deuxième éliminant les formes végétatives produites par les spores activées.

C/ CONCLUSIONS

Notre expérimentation nous conduit aux conclusions suivantes : l'alcool éthylique agit sur les bactéries à des concentrations bien inférieures à celles où il est le plus souvent employé : 70° et même 90°. En moyenne, une concentration de 4, 6° provoque une bactériostase de 24 heures. A 1, 2, 3, 4 degrés, la croissance des bactéries est perturbée. Si ces propriétés devaient être appliquées, il faudrait préciser très exactement les conditions dans lesquelles l'alcool agirait : nos résultats ont toujours été très dépendants du milieu employé et des bactéries étudiées.

Pour interpréter ces résultats, notre étude bibliographique nous a seulement donné les renseignements suivants : l'alcool est oxydé dans la cellule en acide acétique. Son métabolisme dépend d'une alcool-déshydrogénase, elle-même sous l'influence de l'équilibre redox intra-cellulaire. Il perturbe la synthèse enzymatique chez les bactéries. Le caractère succint de ces résultats montre bien le peu d'apport fourni par la bibliographie pour élucider l'action bactériostatique de l'alcool.

*

DEUXIEME PARTIE

ESSAIS D'ACCOUTUMANCE A L'ALCOOL ETHYLIQUE

INTRODUCTION

Nous avons tout d'abord recherché quelques éléments de bibliographie traitant de l'accoutumance à l'alcool éthylique. Les travaux des collaborateurs de PEYNAUD à l'Institut d'Œnologie de Bordeaux, semblent seuls aborder notre problème. En 1963, LAFON (14) étudie l'influence du degré alcoolique sur la croissance des bactéries lactiques et fait des essais de réensemencement de milieux riches en alcool.

1° - Technique.

Des flacons, contenant tous le même milieu de culture mais des quantités d'alcool éthylique croissantes, sont ensemencés . Les flacons contenant les plus fortes concentrations d'éthanol ne donnent aucun signe de multiplication des bactéries ensemencées. L'auteur " part de 1 ml de culture prélevé sur le flacon du degré le plus élevé ayant manifesté une croissance. Il l'ensemence sur un milieu très riche en alcool, n'ayant pas manifesté de développement bactérien. "

2° - Résultats.

D'après LAFON (14), " l'adaptation à l'alcool ainsi étudiée est peu probante. "

Les recherches sur l'accoutumance des bactéries à l'éthanol paraissent assez peu avancées. Il serait intéressant de reprendre et de poursuivre plus loin les travaux de LAFON (14), de mettre au point une technique plus adaptée à cette recherche et de l'appliquer à de nombreuses bactéries.

*

CHAPITRE I

RECHERCHES PERSONNELLES

Notre recherche s'est orientée d'abord vers des essais dans l'esprit de ceux de LAFON (14). A partir de ces résultats, des difficultés et des imperfections ainsi constatées, nous avons mis en œuvre une expérience prolongée pendant 7 mois, selon une technique personnelle.

I - ESSAIS PRELIMINAIRES.

1° - TECHNIQUE.

Nous adoptons un protocole voisin de celui choisi par LAFON (14) à savoir : étudier le comportement de germes ayant manifesté une croissance sur le milieu de concentration alcoolique la plus élevée. En revanche, nous utiliserons des milieux neufs : il ne s'agit pas de réensemencements ; nous mettrons en œuvre un biophotomètre.

Prenons l'exemple du staphylocoque Londres. A partir d'une culture de 24 heures, en bouillon tryptose Difco, nous réalisons une expérience au biophotomètre

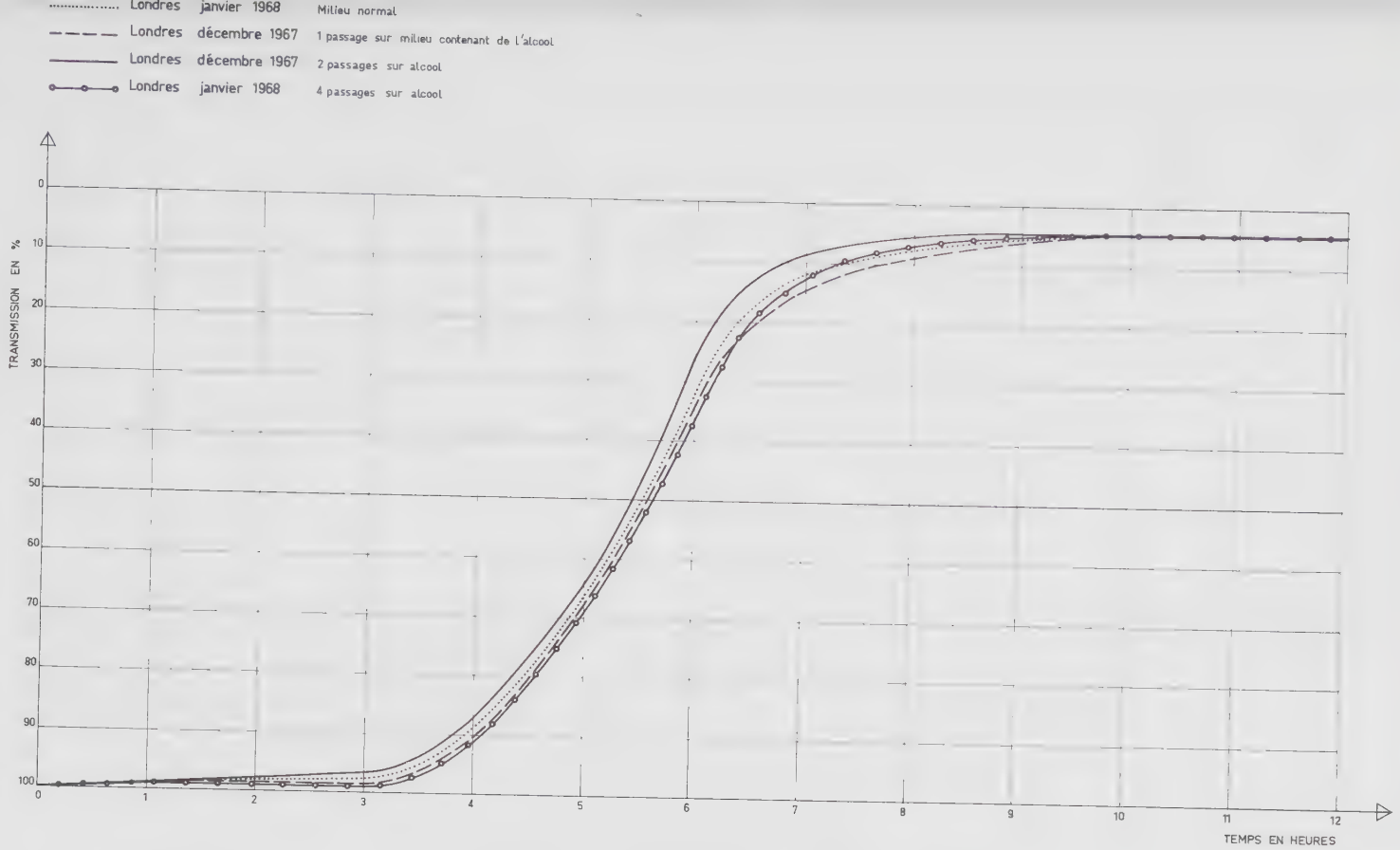


FIGURE 9 - STAPHYLOCOQUE LONDRES
(vérification de la méthode)

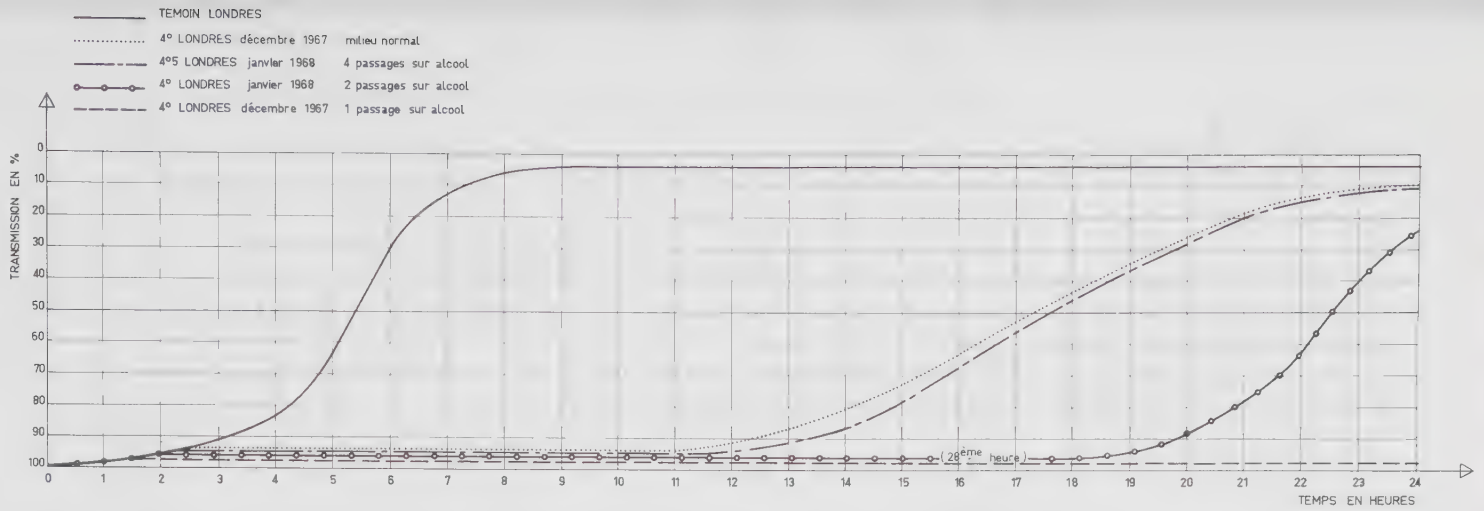


FIGURE 10 – Sensibilité du staphylocoque Londres à 4° d'éthanol

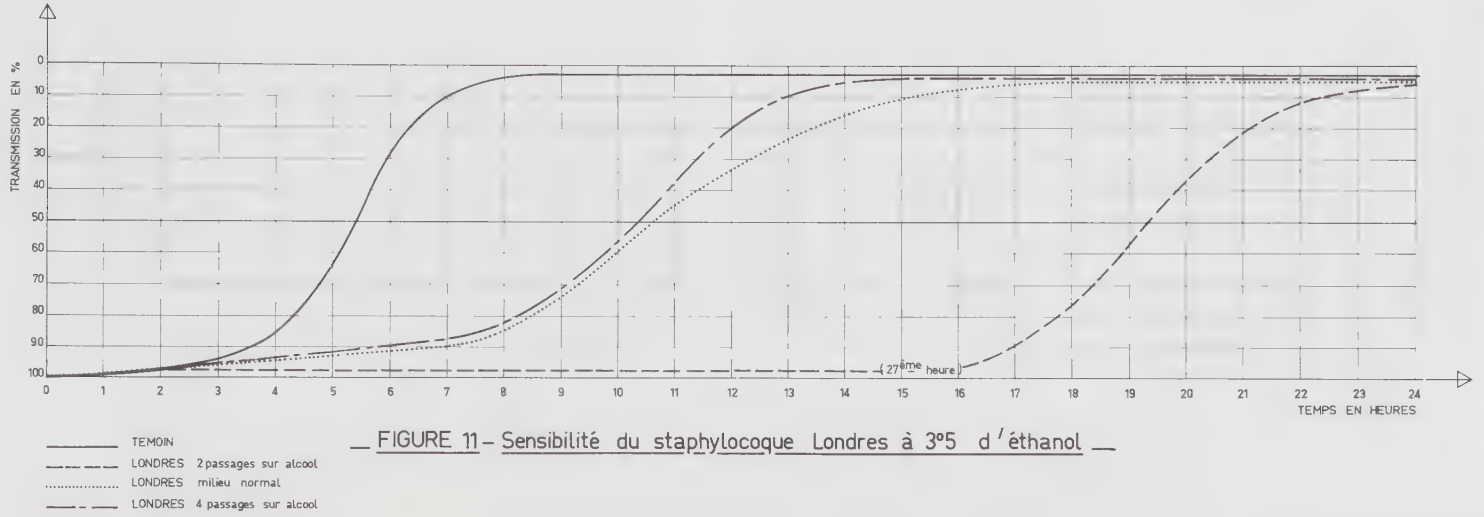


FIGURE 11 – Sensibilité du staphylocoque Londres à 3°5 d'éthanol

selon la technique décrite dans la première partie de nos travaux. Le lendemain, nous prélevons les germes de la cuve dont la concentration en alcool éthylique est la plus forte mais qui manifeste un développement bactérien. Nous comparons les résultats.

2° - RESULTATS

Premiers essais.

Trois séries d'expériences étalées sur un mois donnent le même résultat : les germes semblent devenir de plus en plus sensibles à l'alcool. Comme le montre la figure n° 9, les courbes de croissance témoin peuvent être pratiquement superposées : nous pouvons donc établir des comparaisons. A 4°, la croissance du germe ayant déjà séjourné dans l'alcool est inhibée, celle du germe normal n'est que retardée : figures 10 et 11.

Expériences plus prolongées .

Nous avons repris nos expériences pendant une période plus longue : deux mois. Nous avons tout d'abord observé le même phénomène que lors de nos premiers essais : le germe cultivé sur alcool paraît plus sensible à l'éthanol. Cependant, au bout de 3 à 4 passages sur milieu alcoolisé, le phénomène est inversé et le germe paraît devenir plus résistant comme le montrent les figures n° 10 et 11.

3° - CONCLUSIONS.

Il nous paraît opportun de mettre au point une technique permettant l'étude systématique et rigoureuse du comportement des germes cultivés sur alcool.

II - MISE EN TRAIN D'UNE EXPERIENCE PERSONNELLE ETALEE SUR SEPT MOIS.

1° - LE BUT RECHERCHE.

Nous allons cultiver des bactéries sur milieu nutritif normal et sur milieu contenant de l'alcool éthylique. Les germes subiront le même nombre de repiquages pendant une période assez longue et seront conservés à la même température. Nous pourrons ainsi, par comparaison, constater les effets de l'alcool sur la morphologie, la croissance, et le métabolisme des germes ainsi traités. Nous verrons de même s'ils ont acquis une résistance vis-à-vis de l'alcool.

2° - LES GERMES ETUDIES.

Staphylococcus pyogenes	souche Londres
Escherichia coli	
Proteus mirabilis	souche de l'Institut Pasteur A 235
Bacillus subtilis	
Bacillus cereus	souche de l'Institut Pasteur A 30
Bacillus anthracis	souche de l'Institut Pasteur A 3
Pseudomonas aeruginosa	
Salmonella pullorum	
Klebsiella	

3° - LA CULTURE.

Les milieux.

- Milieux normaux :
  - . bouillon tryptose Difco
  - . gélose tryptose Difco
  - . eau distillée stérile.

- Milieux contenant de l'alcool :
  . bouillon tryptose Difco
  . gélose tryptose Difco
  . eau distillée stérile
  . alcool absolu.

Pour chaque expérience, nous utilisons le même lot de bouillon ou de gélose conservés en flacon de 60 ml. Nous réalisons des gammes de tubes. Si nous opérons en milieu liquide, nous répartissons dans des tubes stériles de l'eau et du bouillon. Nous ensemençons et nous ajoutons l'éthanol en fin d'opération pour éviter toute évaporation. Si nous désirons un milieu gélosé, nous mettons en premier lieu l'eau distillée stérile, puis l'alcool absolu. Enfin, nous ajoutons la gélose tryptose préalablement liquéfiée au bain-marie, puis refroidie autant que possible, de manière à avoir un milieu liquide pour permettre le mélange des trois composants et à éviter, d'autre part, l'évaporation de l'éthanol. Dans tous les cas, les germes ont la même quantité de substance nutritive à leur disposition. Le tableau VIII donne la composition des milieux d'une gamme type.

T A B L E A U VIII

COMPOSITION DES MILIEUX D'UNE GAMME D'ENSEMENCEMENTS

Composants	*milieu normal*	*milieu 1°*	*milieu 2°*	*milieu 3°*	*milieu 4°*
Alcool en ml	0	0, 1	0, 2	0, 3	0, 4
Eau stérile en ml	1	0, 9	0, 8	0, 7	0, 6
Milieu nutritif en ml	9	9	9	9	9

Les ensemencements.

Nous ensemençons les germes parallèlement sur milieu normal et sur milieu contenant de l'alcool. Nous adoptons un rythme de repiquage relativement rapide pour éviter l'évaporation de l'alcool. Nous alternons les passages sur bouillon et sur gélose pour obtenir des germes vigoureux. Le tableau IX montre le rythme de ce repiquage.

TABLEAU IX

RYTHME DES REPIQUAGES

Jour	*lundi*	*mardi*	*mercredi*	*jeudi*	*vendredi*	*samedi*	*dimanche*
Repiquage	+	+	0	+	+	0	0
milieu	bouillon	gélose		bouillon	gélose		

4° - INFLUENCE DE L'ETHANOL SUR LA MORPHOLOGIE DES GERMES.

Technique.

Nous observons l'aspect macroscopique des cultures à la loupe, après isolement. Nous colorons, par la méthode de Gram, des frottis effectués à partir de chaque culture. Le tableau X donne un aperçu des résultats obtenus au bout de sept mois de culture sur alcool.

L'aspect macroscopique des cultures ne change pas beaucoup. Seul Bacillus subtilis perd dès une concentration de 2° son aspect caractéristique de colonies sèches, plates, granuleuses et diffuses pour donner des colonies plus rondes, plus régulières, moins " sèches ".

Nous avons souvent constaté chez le staphylocoque et les Bacillus cereus, anthracis et subtilis, une diminution de leur aptitude à fixer le colorant de Gram. Ceci n'a pas été vérifié dans tous les cas et nous ne pouvons pas conclure. Il serait intéressant de faire une étude systématique et précise dans ce sens.

La morphologie des germes est très affectée au bout de sept mois de culture sur milieux contenant de l'alcool. Nous avons observé des variations de taille : augmentation de la grosseur des staphylocoques Londres, allongement très net du bacille pyocyanique, mais aussi des variations de formes. Nous avons mis en évidence chez Escherichia coli, Klebsiella, Salmonella pullorum, Proteus mirabilis, Bacillus cereus et anthracis des formes plus épaisses, souvent plus courtes, globuleuses, paraissant turgescentes ; certaines bactéries semblent lysées, leurs contours ne sont plus nets, comme si la membrane avait disparu. Ce phénomène est d'autant plus important que la quantité d'alcool est grande. Nous avons vérifié ces caractères pendant un mois.

5° - INFLUENCE DE L'ETHANOL SUR LA COURBE DE CROISSANCE DES BACTERIES.

Technique.

Etude au biophotomètre.

Après sept mois de cultures parallèles sur milieu normal et sur milieux contenant de l'alcool, nous ensemençons tous les germes en milieu normal. Après normalisation, nous comparons leur courbe de croissance au biophotomètre selon la technique énoncée dans la première partie de nos travaux.

Précision de la méthode.

Notre comparaison n'est valable que si des germes, ensemencés le même nombre de fois sur

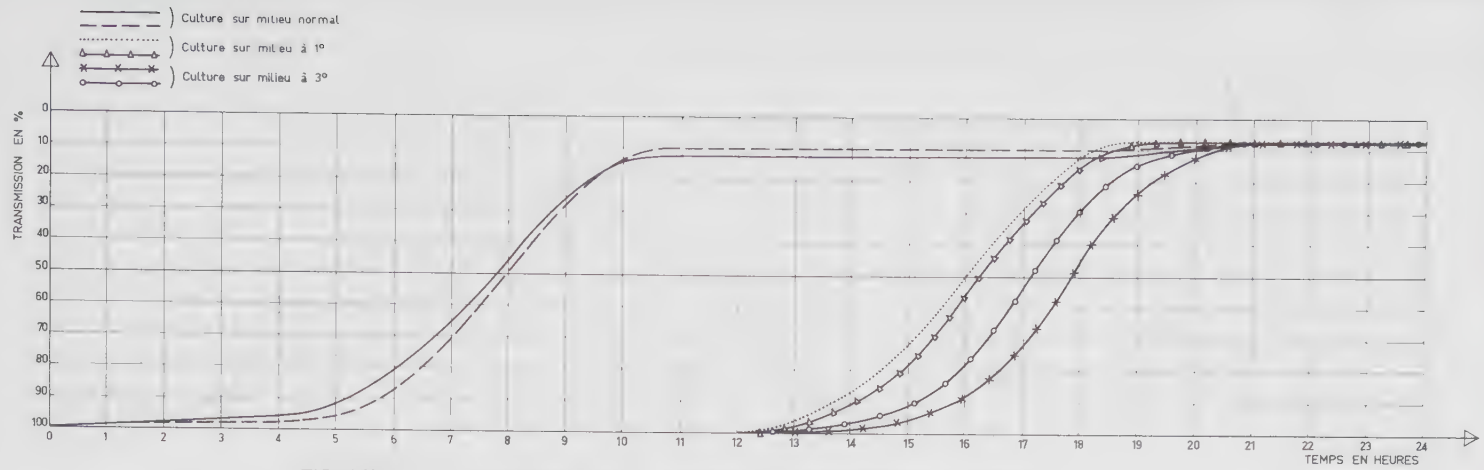
T A B L E A U X

INFLUENCE DE L'ETHANOL

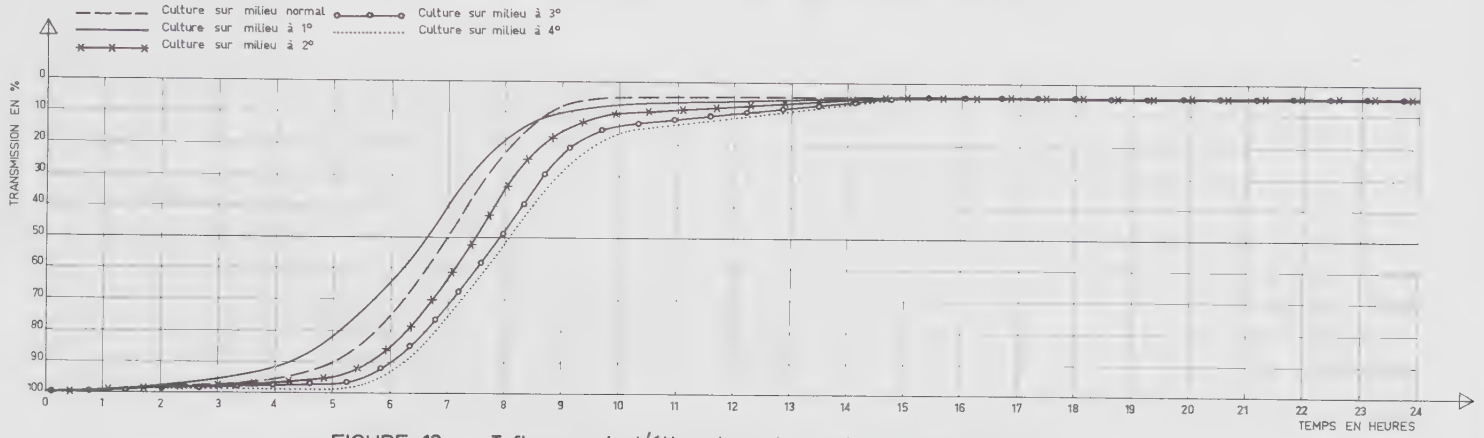
SUR LA MORPHOLOGIE DES GERMES

G E R M E		*MILIEU NORMAL*	*MILIEU 1°*
Staphylococcus pyogenes Londres		Coques gram + en grappe	Certains germes sont plus gros caractère gram + moins net.
Bacillus subtilis		Bacilles courts fins en cheveux gram +	Bacilles + longs presque gram - quelques formes épaisses plus foncées.
Bacillus cereus		Bacille gram +	Bacilles un peu plus épais
Bacillus anthracis		Bacilles gram + assez courts	Bacilles + courts rares formes turgescentes gram-
Enterobactéries	Escherichia coli Proteus mirabilis Salmonella pullorum Klebsiella	Petits bacilles gram -	Formes globuleuses turgescentes à contours peu nets
Pseudomonas aeruginosa.		Petits bacilles courts gram. -	Bacilles plus longs

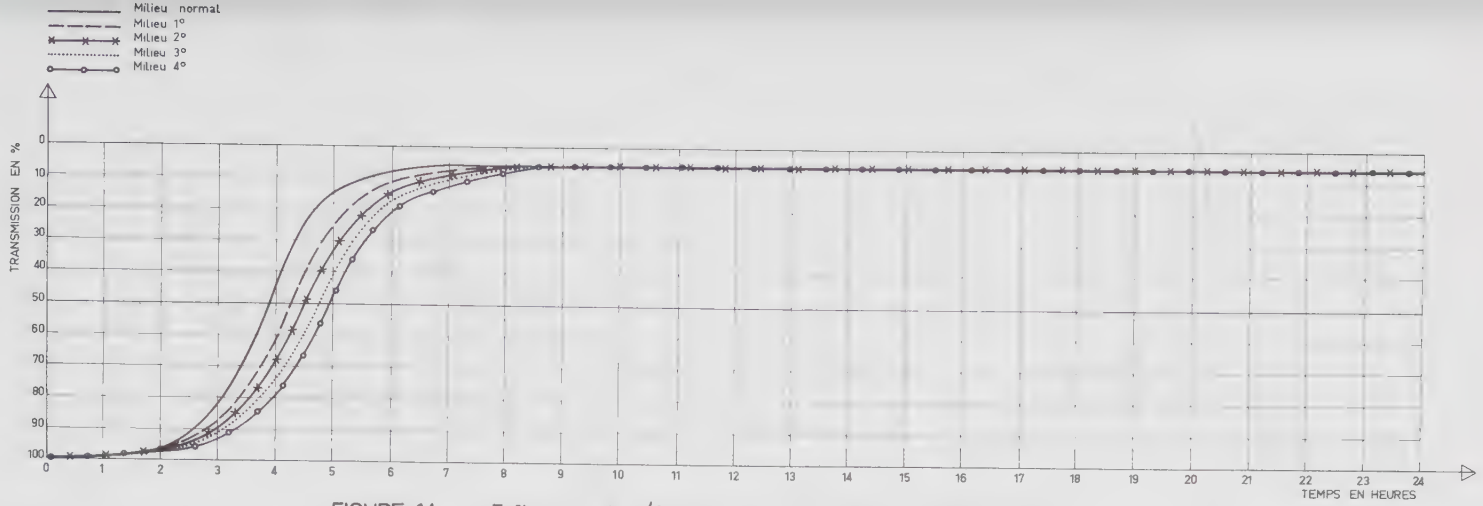
MILIEU 2°	*MILIEU 3°*	*MILIEU 4°*
es germes plus ros sont plus ombreux	Les germes plus gros sont de plus en plus nombreux	Très nombreux germes plus gros le caractère gram + a souvent disparu
acilles longsfins resque gram -	Bacilles à contours peu nets presque gram -	Bacilles presque gram -
acilles très pais quelques ormes turgescenes	Bacilles très épais nombreuses formes turgescentes	Très nombreuses formes turgescentes
acilles fins longs resque gram -	Très nombreuses formes turgescentes	Ne pousse pas
ormes anormales arfois coloration ipolaire	formes géantes germes lysés	Les germes ne sont presque pas colorés les contours sont peu visibles.
acilles très llongés	Bacilles très allongés	Ne pousse pas



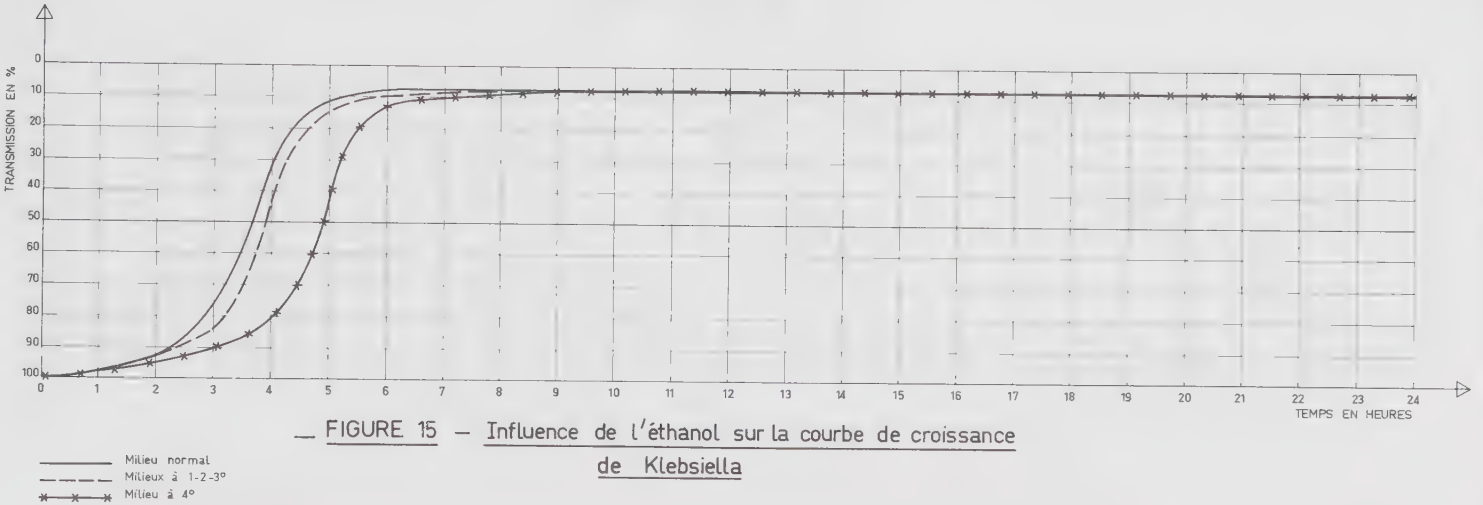
— FIGURE 12 — Vérification de la méthode sur staphylocoque Londres —



— FIGURE 13 — Influence de l'éthanol sur la courbe de croissance du staphylocoque Londres



— FIGURE 14 — Influence de l'éthanol sur la courbe de croissance de Escherichia Coli



— FIGURE 15 — Influence de l'éthanol sur la courbe de croissance de Klebsiella

les même milieux, donnent au biophotomètre les mêmes courbes de croissance, dans nos conditions d'expérience. Nous effectuons donc cette vérification. Nous ensemençons du staphylocoque Londres sur deux tubes différents, contenant le même milieu nutritif : normal ou à 1°, 2°, 3° d'éthanol. Les courbes de croissance obtenues au biophotomètre sont parfois superposées ; nous avons souvent un écart de 15 minutes aux 50 % de transmission, il nous est arrivé une fois d'avoir une heure d'écart. Nous n'interprèterons donc nos résultats qu'au-delà d'une heure d'écart : figure 12.

Résultats.

Nous n'avons pas constaté d'effet notable de l'éthanol sur la courbe de croissance des bactéries, au cours des 17 expériences que nous avons tentées. Les écarts des courbes à 50 % de transmission de la lumière au biophotomètre vont de 15 minutes à 1 heure 30, 3 heures exceptionnellement. Nous sommes au-delà des limites de précision de la méthode vérifiées ci-dessus.

Cependant, tous les résultats vont dans le même sens : nous observons un très léger retard proportionnel au degré alcoolique avec souvent, particulièrement dans le cas du staphylocoque Londres, une stimulation à 1°. Ceci est en accord avec les résultats, obtenus dans la première partie de nos travaux, sous l'influence de très faibles quantités d'éthanol. Le tableau XI et les figures 13, 14 et 15 donnent une idée de nos expériences.

6° - ADAPTATION A L'ETHANOL DE GERMES CULTIVES PENDANT UNE PERIODE PROLONGEE SUR CETTE SUBSTANCE.

Technique.

Nous avons utilisé la méthode des dilutions en tubes en milieu liquide énoncée dans la première partie.

T A B L E A U XI

ACTION DE L'ETHANOL SUR LES COURBES DE CROISSANCE

G E R M E S	*Nb. D'EXPERIENCES*	*ACTION DE L'ALCOOL*	*ECART AUX 50 % DE TRANSMISSION*
Staphylocoque Londres	5	Stimulation à 1° toujours vérifiée résultats anarchiques pour 2°, 3°, 4°, 5°.	Avance maximale 50mn
Escherichia coli	2	Retard proportionnel au degré.	30 mn à 1h 15
Klebsielle	1	Retard proportionnel au degré.	30 mn à 1h 15
Salmonelle	1	Retard proportionnel au degré.	20 mn à 1 h.
Proteus mirabilis	1	Retard proportionnel au degré.	55 mn à 3 h.
Subtilis	1	Voile : résultats inversés.	
Pyocyanique	2	Voile : résultats inversés.	

Cependant, nous évaluons ici la croissance des germes toujours par turbidimétrie mais au photomètre et non par simple appréciation visuelle. Pour chaque culture, résultant des repiquages effectués pendant sept mois, nous ensemençons une gamme de milieux contenant 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 degrés d'alcool. Nous comparons les résultats obtenus.

Résultats.

Malgré sept mois de culture sur éthanol, nous n'avons pas induit une résistance à l'alcool éthylique. La bactériostase de 24 heures est obtenue dans pratiquement tous les cas pour la même concentration d'éthanol.

Cependant, nos résultats laissent apparaître une légère adaptation à l'alcool éthylique. En présence d'éthanol, le trouble des cultures de bactéries accoutumées à l'alcool est plus important que celui des cultures n'ayant jamais été mises en contact avec l'éthanol.

7° - INFLUENCE DE L'ETHANOL SUR LES CARACTERES BIOCHIMIQUES DES BACTERIES.

Nous limitons notre étude à quelques tests simples : la recherche des oxydases, de la peroxydase, de la catalase et de la nitratase nous donne quelques indications sur la respiration, la mise en évidence de la consommation du glucose et du mannitol, l'étude des produits de fermentation par la réaction au rouge de méthyle nous renseignent succintement sur le pouvoir glucidolytique. Enfin, nous étudierons l'évolution du pH.

Technique.

Nous rappelons ici les techniques bien connues que nous avons utilisées.

Recherche des oxydases.

Une oxydase catalyse la fixation sur l'oxygène libre de l'hydrogène enlevé à un substrat.

Nous déposons sur de petits disques de papier Whatman 1 quelques gouttes de dichlorhydrate NN de diméthyl p. phénylène diamine. Le solvant évaporé à l'étuve, nous déposons sur le papier une anse de culture de 24 heures sur gélose. Si la réaction est positive, la semiquinone s'oxyde rapidement, nous obtenons une coloration rouge virant au noir.

Recherche des peroxydases.

La peroxydase réduit le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 qui se trouve formé lors des oxydations à l'air libre, en présence d'un donneur d'hydrogène ou d'un accepteur d'oxygène.

Nous utilisons la méthode à la benzidine. A la surface d'une culture fraîche en milieu gélosé, nous disposons 0, 5 ml de solution de benzidine à 1 pour 100 dans l'acide acétique N et 0, 5 ml d'eau oxygénée à 1 pour 100. Les tubes sont maintenus en position inclinée. Après dix minutes de contact, les colonies prenant une coloration bleu-noir sont dites peroxydase +, celles qui ne se colorent pas dont dites peroxydase -.

Recherche de la catalase.

C'est une enzyme ferroprotéique capable de catalyser la rupture de l'eau oxygénée en l'absence d'accepteur d'hydrogène et d'en libérer l'oxygène.

Dans un tube, nous déposons 1 à 2 ml d'eau distillée. Nous y émulsionnons une quantité suffisante de culture pure pour obtenir une suspension épaisse. Nous ajoutons 2 à 3 gouttes d'eau oxygénée sans agiter. La

présence de bulles de gaz se dégageant de façon plus ou moins intense indique la présence d'une catalase.

Recherche de la nitratase.

Elle nous renseigne sur le pouvoir réducteur des bactéries.

Nous ensemençons sur bouillon peptoné salé contenant 10 g/litre de nitrate de potassium. Après 48 heures d'incubation, nous ajoutons 1 ml de solution d'acide sulfanilique à 0, 2 % dans l'acide acétique. La réaction est positive s'il se développe une coloration rose à rouge clair.

Caractérisation de l'attaque des sucres.

Nous ensemençons sur eau peptonée contenant du glucose en solution à 30 pour 100 ou du mannitol en solution à 20 pour 100 et du rouge de phénol. Le virage au jaune de l'indicateur indique l'acidification du milieu par dégradation des sucres.

Etude des produits de la fermentation du glucose.

Nous ensemençons des milieux de Clark et Lubs et nous effectuons la réaction au rouge de méthyle. L'indicateur est rouge au-dessous de pH 4, 5, si le germe a formé à partir du glucose une quantité appréciable d'acides suffisamment dissociés.

Etude du pH.

Nous effectuerons des mesures de pH au pHmètre.

T A B L E A U XII

ACTION DE L'ALCOOL SUR LES CARACTERES BIOCHIMIQUES

GERMES	OXYDASE					PEROXYDASE					CATALASE					NITRATASE				
	N	1	2	3	4	N	1	2	3	4	N	1	2	3	4	N	1	2	3	4
Staphylocoque Londres	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Escherichia coli	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	+	-	+++	+++	+++	+++	+++
Salmonella pullorun	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++	+	+		+++	+++	+++	++	+
Klebsiella	-	-	-	-	-	++	++	++	+lent	-	++	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++
Proteus mirabilis	-	-	-	-	-	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Bacillus subtilis	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++
Bacillus anthracis	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+++	+++	+++	+++	++
Bacillus cereus	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	+	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++	+++
Bacille pyocyanique	+	+	+	+	+	++	++	++	++	+	++	++	++	+		++	+	-	-	

TABLEAU XIII

ACTION DE L'ALCOOL SUR LES CARACTERES BIOCHIMIQUES

GERMES	GLUCOSE					MANNITOL					ROUGE DE METHYLE					pH				
	N	1	2	3	4	N	1	2	3	4	N	1	2	3	4	N	1	2	3	4
Staphylocoque Londres						+	+	+	+	+	+++	+++	+++	++	-	6,1	6,1	6	5,9	5,9
Escherichia coli	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	-	6,4	6,4	6,4	6,7	6,7
Salmonella pullorum	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	++	+	++	++	-	-	-	6,4	6,4	6,4	6,7	6,8
Klebsiella	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+	+	+	6,3	6,3	6,3	6,4	6,5
Proteus mirabilis	+++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	6,1	6,1	6,1	6,1	6,2
Bacillus subtilis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	++	++	++	-	5				
Bacillus anthracis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-	5,8	6,1	6,8	6,8	6,8
Bacillus cereus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	+	+	+	-	6,1	6,1	6,2	6,4	6,5
Bacille pyocyanique	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					

Résultats.

Nous n'avons pas mis en évidence de très grandes différences de caractères biochimiques. L'alcool n'affecte pas les oxydases ni en général la nitratase ; la réaction de la peroxydase est ralentie pour 3 et 4° chez Proteus mirabilis et Klebsiella, la catalase donne une faible réaction aux degrés les plus forts. Le pouvoir glucidolytique n'est pratiquement pas affecté. Le pH a tendance à monter. Les tableaux XII et XIII résument ces résultats.

III - DISCUSSION.

1° - ESSAIS D'ACCOUTUMANCE.

Nous avons retrouvé les résultats de PEYNAUD : les germes cultivés sur éthanol sont dans une première phase, d'ailleurs très courte, plus sensibles à cette substance et la supportent moins bien que les bactéries cultivées sur milieu normal. Au bout de trois à quatre repiquages, cette sensibilité accrue fait place à une faible adaptation. Les germes mis en contact avec des concentrations d'éthanol de l'ordre du degré paraissent même plus vigoureux : ceci nous fait penser à la possibilité d'utilisation de l'éthanol par les bactéries comme source de carbone. Nous n'avons pas réussi à mettre en évidence l'acquisition d'une résistance nette à l'alcool éthylique.

2° - ACTION DE L'ALCOOL SUR LE METABOLISME BACTERIEN.

Nous avons seulement effleuré le problème au moyen de tests très simples. Nous n'avons pas observé de grandes modifications des propriétés considérées ici. Il faudrait mettre en œuvre une étude systématique de la

respiration au moyen de l'appareil de Warburg . L'action de l'éthanol sur les enzymes bactériennes doit être considérée de nouveau, en isolant les enzymes à partir de cultures d'un germe donné et en observant les variations de résultats induites par l'alcool, en envisageant successivement tous les mécanismes métaboliques.

3° - ACTION DE L'ALCOOL SUR LA MORPHOLOGIE DES BACTERIES.

Nous avons observé de très nettes modifications de morphologie. Nous voudrions en connaître l'origine : est-ce une perturbation du métabolisme, un effet chimique ou une action physique au niveau de la membrane bactérienne ? Nos observations au microscope, notre étude bibliographique mettant en évidence l'action physique de l'éthanol sur les mitochondries, sur les systèmes oxydo-réducteurs de la cellule justement situés dans la membrane bactérienne, nous font pencher pour la seconde hypothèse. Cependant tout ceci reste à vérifier.

*

CHAPITRE III

QUELQUES ESSAIS D'EXPLICATION A LA LUMIERE DE LA BIBLIOGRAPHIE

I - INTRODUCTION

La culture de différents germes sur milieu contenant de l'alcool éthylique nous a amenée à constater de nombreux effets de l'éthanol sur les bactéries. Cependant nous n'en connaissons pas la cause. Nous avons recherché quelques explications à ces phénomènes en consultant les travaux déjà effectués en ce sens. Trois sujets ont retenu notre attention : les germes utilisant l'alcool comme source de carbone, la formation d'alcool par les bactéries, enfin une étude de résistance à l'éthanol des bactéries lactiques.

II - GERMES UTILISANT L'ALCOOL COMME SOURCE DE CARBONE.

FINCHER et PAYNE (8) en 1962, isolent à partir du sol une bactérie capable d'oxyder les éthers - glycols et concluent : " On peut isoler des bactéries

capables d'oxyder les molécules organiques synthétiques, par enrichissement, en utilisant le substrat représentatif comme source de carbone. Une bactérie est limitée à l'oxydation des composés ayant seulement certains groupes chimiques et chaînes : ceux pour lesquels l'organisme a une information génétique qui supporte la formation de l'enzyme induite appropriée. "

WILLIAMS et MAYBERRY (23) en 1966, envisagent le métabolisme d'alcools linéaires à chaîne de longueur variée, par une espèce de Pseudomonas et arrivent aux résultats suivants : " Pseudomonas C 12 B pousse sur des alcools linéaires primaires allant de C_2 à C_{11}, le germe est capable de les oxyder. Les extraits cellulaires de bactéries contiennent une déshydrogénase liée au NAD, active avec ces alcools, des alcools primaires ramifiés et secondaires linéaires. La limitation de la croissance et de l'oxydation par les cellules entières au dépens de l'alcool à sept carbones n'est pas due au manque d'enzyme mais peut certainement être attribuable à la faible pénétration ou à quelque toxicité non encore expliquée d'un produit intermédiaire. "

Nous pouvons en conclure qu'il doit être possible de cultiver des bactéries sur un milieu contenant de l'alcool éthylique comme seule source de carbone. A partir de cette expérience, il serait intéressant d'isoler l'enzyme responsable de l'oxydation de l'éthanol et de voir, par comparaison avec des bactéries cultivées sur milieu normal, si cette enzyme existe déjà ou si elle a été induite par la culture sur éthanol. Nous retrouvons dans les conclusions de WILLIAMS et MAYBERRY (23) une allusion à la liaison entre la toxicité de l'alcool et sa pénétration dans la cellule : ceci nous fait souligner, une fois encore, l'importance d'une recherche de l'action de l'éthanol sur la membrane bactérienne.

III - FORMATION D'ALCOOL PAR LES BACTERIES.

DAWES (4) a publié en 1963, une étude très complète sur les aspects comparatifs de la formation d'alcool par les micro-organismes. Il a mis en évidence quatre types de réaction :

- Type 1 chez les levures, les fungi, les protozoaires et quelques bactéries : Zymosarcina ventriculi.

$$\text{glucose} + 2\ \text{NAD} + 2\ \text{ADP} + ?\ \text{P} \longrightarrow 2\ \text{pyruvate} + 2\ \text{NADH}_2 + 2\ \text{ATP}$$

$$CH_3\text{-}CO\text{-}COOH \xrightarrow[Mg^{2+}]{\text{thiamine pyrophosphate}} CH_3CHO \xrightarrow[\text{éthanol déshydrogénase}]{NADH_2} CH_3\text{-}CH_2OH + CO_2$$

A partir d'une molécule de glucose, il y a formation de deux molécules d'éthanol.

- Type 2 chez les Entérobactéries et les Clostridia.

L'acide pyruvique subit les transformations suivantes :

$$CH_3\text{-}CO\text{-}COOH \xrightarrow[Mg^{2+}\ CoA]{\text{thiamine pyrophosphate}} CH_3\text{-}COSCoA + \begin{cases} HCOOH & \text{(Entérobactéries)} \\ H + CO_2 & \text{(Clostridia)} \end{cases}$$

$$CH_3\text{-}COSCoA \xrightarrow{NADH_2} CH_3\text{-}CHO \xrightarrow[\text{éthanol déshydrogénase}]{NADH_2} CH_3\text{-}CH_2OH$$
$$+CoASH$$

on obtient au maximum 0, 8 mole d'éthanol pour une mole de glucose.

- Type 3 chez Zymomonas mobilis et anaerobia.

La glycolyse produit seulement la moitié de l'énergie dégagée dans les réactions de type 1 et 2 :

$$\text{glucose} + 2\ \text{NAD} + \text{ADP} + \text{P} \longrightarrow 2\ \text{pyruvate} + 2\ \text{NADH}_2 + \text{ATP}$$

- Type 4 chez les organismes hétérolactiques comme Leuconostoc mesenteroides.

$$\text{glucose} \longrightarrow \text{lactate} + \text{éthanol} + \text{CO}_2$$

D'autres types de réactions aboutissent à la formation d'acétyl méthyl carbinol, de fuseloils, ou d'éthanol à partir de la choline.

Les bactéries produisent donc de l'alcool, cette réaction met en jeu une alcool-déshydrogénase. Y-a-t-il une liaison entre cette production d'éthanol et sa toxicité vis-à-vis de la cellule : adaptation ou sensibilisation chez les forts producteurs d'alcool par exemple ?

IV - ETUDE SUR LES BACTERIES LACTIQUES.

GINI et VAUGHN (9) utilisent le test de variation de LURIA et DELBRUCK (15) dans le cas des réactions des bactéries lactiques vis-à-vis de l'alcool éthylique. Ce test permet de voir si un bacille devient tolérant à l'alcool par adaptation ou si le milieu ambiant sélectionne un mutant qui apparaît spontanément au milieu d'un grand nombre de cellules sensibles. Les auteurs laissent incuber pendant 24 heures un milieu contenant une forte proportion d'alcool et recherchent le nombre de cellules vivantes.

GINI et VAUGHN (9) concluent ainsi : " le micro-organisme acquiert une résistance à l'alcool par mutation ou quelque autre modification de la cellule qui est

transmise à la descendance. Les organismes résistants sont alors sélectionnés par le milieu ambiant. Cette sélection peut expliquer le long intervalle de temps nécessité par ces organismes pour se développer à un degré élevé. Une valeur de probabilité très inférieure à 0,005 soutient la conclusion qu'un type mutationnel de distribution est apparu. Une valeur de probabilité de 0,4 montre que les résultats obtenus ne sont pas dus à une grossière erreur expérimentale. Donc l'opinion selon laquelle les organismes rencontrés dans les vins altérés sont des variantes viables de la culture d'origine, les nouveaux variants étant capables de survivre et de se développer dans les vins de dessert, au moins en partie est valable. "

Ceci doit être vérifié pour les bactéries que nous avons étudiées ici. Nous avons nous-même constaté sur des géloses contenant 0 à 10 degrés d'éthanol que les bactéries ne se développaient qu'au bout de 4 ou 5 jours. Les colonies obtenues étaient minuscules et très peu nombreuses. Il pourrait s'agir de mutants.

*

CONCLUSIONS

D'après la simple constatation d'un net retard de croissance de Candida albicans provoqué par l'alcool éthylique à la concentration de 1°5, nous avons voulu préciser l'action de l'éthanol à faible degré sur les bactéries. Nos travaux nous ont fait découvrir l'étendue du problème posé. Nous avons obtenu certains résultats et entrevu de nombreuses voies de recherche.

NOS RESULTATS.

Nous avons voulu faire un travail de synthèse et ne pas nous limiter à l'étude d'une bactérie ou d'un mécanisme donné. Nous avons mis au point au biophotomètre une technique simple de normalisation permettant l'étude systématique et la comparaison des courbes de croissance d'un grand nombre de bactéries.

L'alcool, dès une concentration supérieure à 1°, ralentit la croissance de tous les germes étudiés ici. Ce ralentissement est de plus en plus accentué si l'on augmente la quantité d'éthanol. En moyenne pour 4°6 nous obtenons une bactériostase de 24 heures. Il est très important de préciser les conditions expérimentales pour comparer les résultats.

Nous avons étudié le comportement de bactéries cultivées sur milieu contenant de l'alcool pendant sept mois. Nous n'avons pas mis en évidence une nette résistance des germes à l'éthanol. Les quelques tests effectués chez ces bactéries n'ont pas montré de caractères biochimiques particuliers. En revanche, la morphologie des germes a été très affectée par l'alcool et nous avons observé de nombreuses formes aberrantes.

QUELQUES VOIES DE RECHERCHE.

Pour préciser l'action de l'éthanol sur la croissance des bactéries, il serait bon d'étudier les effets de concentrations inférieures au degré pour savoir si l'alcool ralentit la croissance même en très faible quantité, la freine de plus en plus jusqu'à la bactériostase complète et devient ensuite bactéricide. Il peut aussi y avoir d'abord stimulation de la croissance puis ralentissement, bactériostase et enfin pouvoir bactéricide.

Il serait intéressant de reprendre notre expérience d'accoutumance et d'étudier au moyen de l'appareil de Warburg le métabolisme des bactéries cultivées sur l'alcool, leur respiration et l'évolution de leur équipement enzymatique. L'obtention de mutants par la méthode de Luria et Delbruck et la comparaison de leur métabolisme avec celui des bactéries normales et de bactéries accoutumées à l'alcool donneraient des indications précieuses.

LES APPLICATIONS POSSIBLES.

Nous avons mis en évidence le ralentissement de la croissance bactérienne par de faibles concentrations d'alcool. Il est donc plausible d'imaginer une synergie entre l'éthanol et d'autres substances bactériostatiques ou bactéricides. Nous pouvons trouver des applications en

pharmacie en recherchant par exemple des synergies avec les antibiotiques, dans la stérilisation : nous avons évoqué la possibilité d'une tyndallisation à froid. En œnologie, le sujet ne paraît pas dépourvu d'intérêt. L'action de l'alcool sur les bactéries intervient pour une grande part dans les qualités du vin : ses propriétés bactéricides sont peut-être renforcées par l'éthanol, sa qualité pourrait certainement être améliorée par une connaissance accrue de l'action de l'éthanol sur les bactéries responsables de la fermentation malo-lactique, sa conservation étant assurée dans une certaine mesure par l'action bactériostatique de l'alcool sur les bactéries acétiques.

*

BIBLIOGRAPHIE

1 - ANTHONY C., ZATMAN L. J. - Biochem. J. 1965, 96, 808-812.

2 - BALTSCHEFFSKY- Biochem. J. G. B. 1964, 92, 34P-35P .

3 - BARKER H. A. - Bacterial fermentations, 1956, chapitre 1, John Wiley and sons - Inc. New- York.

4 - DAWES E. A. - J. Gen. Microbiol. G. B., 1963, 32, 151-155.

5 - DELAUNAY D. - Thèse Doctorat Université (Pharmacie) Bordeaux, 1964.

6 - DELEY J., KERSTERS K. - Bacterial Rev., 1964, 28, 164-180.

7 - DUCHENNE J. - Thèse Doctorat Etat (Pharmacie), Paris 1961.

8 - FINCHER, PAYNE - Appl. microbiol. U. S. A., 1962, 10, 542-547.

9 - GINI B., VAUGHN R. H. - Amer. J. Enol. Vitic., 1962, 13, 20.

10 - HOLMES P. K., LEVINSON H. S. - Curr. Mod. Biol. Netherl. 1967, 1, 256-258.

11 - JOHNS A. T., BARKER H. A. - J. Bacteriol. U. S. A. 1960, 80, 837-841.

12 - KUSHNER - Biochem. J. G. B., 1959, 73, 17 p.

13 - KUSHNER - Biochem. J. G. B., 1960, 75, 386-395.

14 - LAFON-LAFOURCADE S. - Communication personnelle.

15 - LURIA S. E., DELBRUCK - Genetics 1943, 28, 491-511.

16 - MASQUELIER - Nutritio et Dieta, 1968, 10, 159-175.

17 - Mc PHEDRAN Peter, SOMMER C. C., LIN - J. Bacteriol. U. S. A., 1961, 81, 852-857.

18 - PALMIERI F., FRANCAVILLA A., DINOI P. - G. Biochim. Ital., 1965, 14, 376-381.

19 - PORTER - Bacterial chemistry and physiology, 1946, chapitre IV - John Wiley and Sons Inc. New-York.

20 - ROSENBERG E., HOLMES P. - J. Bacteriol. U. S. A. 1965, 89, 1212-1216.

21 - THEOHAROV B., VELITCHKOV V., STEPHANOWA Z. - Ann. Histochim. Fr., 1961, 6, 523.

22 - WAND H. - Biochemical Pharmacology, 1966, 15, pp. 1491-1495.

23 - WILLIAMS P. J., MAYBERRY W. R. - Appl. Microbiol. U. S. A. 1966, 14, 156-160.

*

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION 3

PREMIERE PARTIE : Pouvoir bactériostatique de faibles concentrations d'alcool éthylique .. 5

CHAPITRE I : Quelques éléments de bibliographie 6

I - LES TRAVAUX DE DUCHENNE 6

1° Détermination de la dose bactériostatique 6

2° Expériences effectuées au moyen du biophotomètre 9

II - LES TRAVAUX DE L'INSTITUT D'ŒNOLOGIE DE BORDEAUX 9

1° Influence du degré alcoolique sur la croissance des bactéries lactiques. 10

2° Degré alcoolique limite de croissance des bactéries suivant la nature du milieu nutritif 11

III - CONCLUSIONS 12

Pages

CHAPITRE II : Recherches personnelles 13

A/ RECHERCHES EXPERIMENTALES 13

I - BACTERIOSTASE DE 24 HEURES 13
1° - Technique 14
2° - Les germes étudiés 18
3° - Les résultats. 18
4° - Variation des résultats au cours des différentes expériences 18
5° - Discussion 22

II - ACTION DE FAIBLES CONCENTRATIONS D'ALCOOL ETHYLIQUE. 22
1° - Etude du retard aux 50 % de transmission 22
2° - Influence de très faibles quantités d'éthanol 24

B/ INTERPRETATION DES RESULTATS EXPERIMENTAUX. 25

I - CATABOLISME DE L'ALCOOL 25

II - LE MATERIEL ENZYMATIQUE MIS EN JEU PAR LES BACTERIES POUR METABOLISER L'ALCOOL ETHYLIQUE 26

III - MODE D'ACTION DE L'ALCOOL SUR LES BACTERIES 27
1° - Action sur les mitochondries 27
2° - Action sur la synthèse enzymatique 27
3° - Action sur les spores 28

C/ CONCLUSIONS 28

Pages

DEUXIEME PARTIE : Essais d'accoutumance à l'alcool éthylique 29

INTRODUCTION 30

CHAPITRE I : Recherches personnelles 32

I - ESSAIS PRELIMINAIRES 32

1° - Technique 32
2° - Résultats 33
3° - Conclusions 33

II - MISE EN TRAIN D'UNE EXPERIENCE PERSONNELLE ETALEE SUR 7 MOIS 34

1° - Le but recherché 34
2° - Les germes étudiés 34
3° - La culture 34
4° - Influence de l'éthanol sur la morphologie des germes 36
5° - Influence de l'éthanol sur la courbe de croissance des bactéries 37
6° - Adaptation à l'éthanol des germes cultivés pendant une période prolongée sur cette substance 39
7° - Influence de l'éthanol sur les caractères biochimiques des bactéries 41

III - DISCUSSION 46

1° - Essais d'accoutumance 46
2° - Action de l'alcool sur le métabolisme bactérien 46
3° - Action de l'alcool sur la morphologie des bactéries 47

Pages

CHAPITRE III : Quelques essais d'explication à la lumière de la bibliographie 48

I - INTRODUCTION 48

II - GERMES UTILISANT L'ALCOOL COMME SOURCE DE CARBONE 48

III - FORMATION D'ALCOOL PAR LES BACTERIES 50

IV - ETUDE SUR LES BACTERIES LACTIQUES 51

CONCLUSIONS 53

BIBLIOGRAPHIE 56

*
* *

Editions BERGERET - 2, rue Bergeret - BORDEAUX
- Téléphone 91-12-59 -